



Activation du Récepteur Minéralocorticoïde vasculaire et néphrotoxicité de la ciclosporine

Jean-Philippe Bertocchio

► To cite this version:

Jean-Philippe Bertocchio. Activation du Récepteur Minéralocorticoïde vasculaire et néphrotoxicité de la ciclosporine. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066032 . tel-01134827

HAL Id: tel-01134827

<https://theses.hal.science/tel-01134827>

Submitted on 24 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED394 « Physiologie et Physiopathologie »

*U1138 Équipe 1 « Récepteur Minéralocorticoïde : Physiopathologie et innovations
thérapeutiques »*

Service de Néphrologie – CHU de Reims

Activation du Récepteur Minéralocorticoïde vasculaire et néphrotoxicité de la ciclosporine

Par Jean-Philippe BERTOCCHIO

Thèse de doctorat de Physiologie

Dirigée par le Docteur Frédéric JAISSER et le Professeur Philippe RIEU

Présentée et soutenue publiquement le 16 février 2015

Devant un jury composé de :

Monsieur le Professeur Eric RONDEAU, PU-PH, Président

Madame le Professeur Marie ESSIG, PU-PH, Rapporteuse

Madame le Docteur Anna Maria GOMEZ, DR Inserm, Rapporteuse

Monsieur le Professeur Eric THERVET, PU-PH, Examineur

Monsieur le Docteur Antoine OUVRARD-PASCAUD, MCU, Examineur

*« Ce qui peut être contrôlé n'est jamais tout à fait réel,
ce qui est réel ne peut jamais être rigoureusement contrôlé. »*

Attribué à Vladimir Nabokov

« Chante et déborde [...], guéris ton âme avec des chants nouveaux »

Friedrich Nietzsche, Ainsi parlait Zarathoustra

*A toutes celles et ceux qui, un jour,
ont cru plus loin que l'espérance.*

Remerciements

A Monsieur le Pr. Rondeau pour avoir accepté de présider ce jury, trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude et mon profond respect.

A Mesdames le Pr. Essig et le Dr Gomez pour avoir accepté de juger et rapporter ce travail, trouvez ici le témoignage de toute ma gratitude et tout mon respect.

A Messieurs le Pr. Thervet et le Dr. Ouvrard-Pascaud pour avoir accepté de juger ce travail, trouvez ici le témoignage de toute ma gratitude et tout mon respect.

A Monsieur le Dr. Jaisser pour m'avoir proposé ce sujet, accueilli dans son laboratoire et dirigé ce travail de bout en bout, trouvez ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance et mon plus profond respect.

A Monsieur le Pr. Rieu pour m'avoir accueilli dans son service pendant 7 années, formé à la Néphrologie et par-dessus tout permis de développer un esprit critique, trouvez ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance et mon plus profond respect.

Aux membres de l'équipe 1 (Soumaya, Claudine, Fouad, Antoine, Basile, Isabelle, Smaïl, Violaine, Céline, Riccardo, Jonatan, Vincent, Brigitte, Nicolette, Maryse, Sonia, Guillaume) pour leur présence, leur aide et tous les moments passés ensemble à la paillasse, l'animalerie, au bureau ou au café ! J'ai tellement appris grâce à vous...

Aux membres des autres équipes des Cordeliers, de l'équipe 8 (Isabelle et Fabienne pour le travail sur le côté encore « obscur » de ce projet mais aussi Bertrand pour la « citadelle ») et de l'équipe 3 (Gaëlle pour le konelab) : merci pour ces moments passés ensemble.

A celles (particulièrement Jenny et Aldjia mais aussi Gwennan et Mylène) et ceux (Cristian) qui ont rendu ce travail possible en y participant : je n'en serais pas là sans vous.

Aux membres (médicaux et paramédicaux) du service de Néphrologie de Reims qui m'ont accueilli pendant 7 ans, la liste est longue mais je n'oublie personne, trouvez ici toute ma gratitude pour tout ce que j'ai appris à vos côtés et par vous.

A celles et ceux qui ont participé à l'étude clinique : merci aux infirmières, aides-soignantes et secrétaires de l'hôpital de jour qui ont activement rendu cette étude possible ; à Florine pour tout son travail toujours dans la bonne humeur ; au Pr. Nazeyrollas et au Dr. Coralie Barbe non seulement pour leurs aides méthodologiques indispensables mais aussi pour avoir cru en ce travail ; et aux Drs. Lavaud et Toupance qui ont su convaincre les malades et faire que cette étude aille jusqu'au bout.

Enfin, à toutes celles et tous ceux qui, à un moment donné, de près ou de loin, ont dû me supporter et qui, par un mot, un regard, une présence, ont su m'apporter un moment de soutien, ce travail est aussi le leur.

Abréviations

11- β HSD2 : enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2

Aldo : Aldostérone

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARAI : Antagoniste du Récepteur de l'Angiotensine II

ASDN : Aldosterone Sensitive Distal Nephron

AUC : Area Under the Curve

C : Canrénoate

Ca²⁺ : Calcium

CaN : Calcineurine

Cav1.2 : Sous-unité α du canal calcique voltage-dépendant de type L

CCLT : Canal calcique voltage-dépendant de type L

CE : Cellules Endothéliales

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

Ciclo : Ciclosporine

CMLV : Cellules Musculaires Lisses Vasculaires

CNA : sous-unité A de la calcineurine

CNB : sous-unité B de la calcineurine

COX-2 : cyclooxygénase-2

CpN : cyclophiline

CypA : cyclophiline A

CRF : Case Report Form

CsA : Ciclosporine

Ctrl : Contrôle

CYP3A4 : isoforme 3A4 du cytochrome P450

CYP3A5 : isoforme 3A5 du cytochrome P450

DBD : DNA-Binding Domain

DFGe : Débit de Filtration Glomérulaire estimé

ECG : Électrocardiogramme

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

eNOS : endothelial Nitric-Oxide Synthase

EpleCsAT : Eplerenone in CsA-treated Transplant recipients
 FK506 : Tacrolimus
 G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
 HDL : High-Density Lipoprotein
 HE : Hémalun-Eosine
 HRE : Hormon Response Element
 IEC : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'angiotensine
 IL-2 : Interleukine 2
 IL-4 : Interleukine 4
 iNOS : inducible Nitric-Oxide Synthase
 IP₃R : Récepteur de l'inositol tri-phosphate
 KO : Knock-Out
 KU : Potassium urinaire
 LBD : Ligand-Binding Domain
 LDL : Low-Density Lipoprotein
 MDRD : Modification of Diet in Renal Disease formula
 MLC2 : chaîne légère de la myosine
 MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine
 mTOR : mammalian Target of Rapamycin
 NaU : Sodium urinaire
 NCC : Na⁺-Cl⁻ cotransport, cotransporteur sodium chlore
 NF-AT : Nuclear Factor of Activated T cells
 NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
 NO : monoxyde d'azote (Nitric-Oxide)
 NODAT : New Onset Diabetes mellitus after Transplantation
 NTD : N-Terminal Domain
 NYHA : New-York Heart Association
 PFA : Paraformaldéhyde 4%
 Pgp : P-glycoprotein
 qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction
 RM : Récepteur Minéralocorticoïde
 ROC : Receiver Operating Characteristic
 ROMK : Renal Outer Medullary K⁺ channel
 ROS : Reactive Oxygen Species

RyR : Récepteur de la ryanodine

SD : Standard Deviation

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate 1%

SEM : Standard Error of the Mean

SRAA : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

Tac : Tacrolimus

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF β : Transforming Growth Factor β

VH : Véhicule

Sommaire

Remerciements	3
Abréviations	4
Sommaire	7
Introduction	9
Néphrotoxicité de la ciclosporine	11
Pharmacologie de la ciclosporine	11
Mécanismes d'action de la ciclosporine	13
Utilisations cliniques de la ciclosporine	16
Minéralocorticoïdes en physiopathologie	26
Le Récepteur Minéralocorticoïde et ses ligands	26
Le Récepteur Minéralocorticoïde en physiopathologie	28
Ciclosporine et Système Rénine-Angiotensine Aldostérone	33
Essais cliniques de limitation de la toxicité rénale de la ciclosporine	35
Actions sur le traitement immunosuppresseur	35
Autres actions	36
Objectifs de la thèse	39
Matériel et méthodes	40
Etude expérimentale	40
Modèles animaux	40
Analyses	43
Etude clinique	46
Recrutement des patients	47
Protocole expérimental	48
Recueil et analyse des données	49
Analyses statistiques	49
Résultats	50
Résultats préliminaires	50
Article 1	52
Discussion	80
Article 2	84
Discussion	87

Article 3	89
Discussion	116
Perspectives	118
Conclusion.....	120
Bibliographie	121
Annexes	138
Annexe 1 : Revue « aldostérone et pathologies rénales »	138
Annexe 2 : Revue « activation du Récepteur Minéralocorticoïde dans les maladies rénales chroniques »	148
Annexe 3 : Notice d'information diététique aux patients participant à l'étude EpleCsAT: Safety.....	159
Table des illustrations.....	160
Table des tableaux	161

Introduction

La transplantation rénale est, avec l'épuration extra-rénale (hémodialyse ou dialyse péritonéale), un des traitements de l'insuffisance rénale terminale (1, 2). La survie en transplantation dépend en partie de la survie du transplant (3), elle-même limitée par l'apparition d'une dysfonction chronique du transplant (4). En France en 2011, parmi les 31100 patients transplantés rénaux, 925 (soit environ 3%) ont eu recours à une technique d'épuration extra-rénale de façon chronique (hémodialyse ou dialyse péritonéale) par perte de fonction du transplant (5). Cette perte de fonction du transplant peut être due soit au décès du receveur, à un rejet aigu non contrôlé, à la récurrence de la maladie initiale sur le transplant soit à la dysfonction chronique du transplant. La perte de fonction par dysfonction chronique du transplant représente la proportion la plus importante des causes de retour en dialyse chez les patients transplantés rénaux : en 2013, elle représentait 2,4% de l'ensemble des patients transplantés rénaux australiens et plus de 70% des causes de retour en dialyse (6). Cette dysfonction chronique du transplant est due en partie à des phénomènes de rejet non contrôlés par le traitement immunosuppresseur et/ou en partie à la toxicité de ces mêmes médicaments immunosuppresseurs (4).

Les anticalcineurines (comme la ciclosporine et le tacrolimus) sont de puissants immunosuppresseurs utilisés depuis plus de 30 ans en transplantation d'organes (7, 8), greffe de tissu et au cours de maladies dysimmunitaires (9, 10). Elles ont permis d'augmenter le taux de survie des patients transplantés et la durée de vie des greffons (7). Les anticalcineurines représentent à l'heure actuelle la base du traitement immunosuppresseur en transplantation rénale : aux Etats-Unis (11) et en Australie (6), plus de 90% des patients sont traités par anticalcineurine au moment de la transplantation ; en France en 2012, parmi les 3044 nouveaux patients transplantés rénaux, 2797 patients (soit plus de 90%) étaient traités par au moins une des deux anticalcineurines à 30 jours après transplantation rénale¹. Compte tenu de son excellent rapport coût-efficacité, la ciclosporine a été reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé comme traitement immunosuppresseur indispensable parmi les traitements immunosuppresseurs anti-rejet (12).

99999999_____

¹ Données recueillies *via* l'agence de la Biomédecine à partir d'un questionnaire rempli par les centres français de transplantation rénale à 30 jours post-transplantation.

Les principaux effets indésirables de la ciclosporine sont connus depuis son utilisation en clinique : l'hypertension artérielle et la néphrotoxicité sont les principaux (7).

L'aldostérone contrôle la pression artérielle en maîtrisant la volémie par son action sur l'activation du Récepteur Minéralocorticoïde (RM) présent dans les cellules principales du néphron distal (Aldosterone Sensitive Distal Nephron, ASDN). Le RM est exprimé aussi dans d'autres types cellulaires : son action n'y est alors pas liée à un transport vectoriel de sodium et de potassium comme dans le cas de l'ASDN (13). Dans les vaisseaux, il est exprimé par les cellules endothéliales (14) et les cellules musculaires lisses (15) où il participe au contrôle du tonus vasculaire (16).

Notre hypothèse est que l'activation du RM dans les vaisseaux participe à la néphrotoxicité de la ciclosporine.

Les objectifs de cette thèse sont :

- d'étudier l'implication des RM des vaisseaux et les mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine chez l'animal
- de tester la sécurité d'utilisation d'un antagoniste du RM chez les patients transplantés rénaux traités par ciclo

Cette thèse a donc été développée selon deux axes :

- les travaux expérimentaux proposés permettent de préciser les bases d'un traitement néphroprotecteur par l'utilisation des antagonistes pharmacologiques du RM
- les travaux cliniques permettent d'étudier la tolérance d'un antagoniste du RM (l'éplérénone) dans la population d'intérêt (transplantés rénaux traités par ciclosporine) ainsi que l'intérêt potentiel d'un biomarqueur d'efficacité.

Néphrotoxicité de la ciclosporine

Le mode d'action de la ciclosporine est partiellement compris. Ses effets secondaires rénaux sont fréquents et limitent son utilisation. Ils sont liés à sa pharmacologie puisqu'il s'agit d'un médicament à marge thérapeutique étroite : la différence entre la dose minimale efficace et la dose maximale tolérée est faible.

Pharmacologie de la ciclosporine

Initialement à la recherche de nouvelles molécules ayant des propriétés antibiotiques, une équipe de scientifiques des laboratoires Sandoz a découvert dans le sol Norvégien un champignon microscopique (*Tolypocladium inflatum*) qui produit une substance ayant des propriétés inhibitrices sur la prolifération des autres souches de champignons (17). La ciclosporine est la substance qui en a été isolée : il s'agit d'un endécapeptide cyclique ($C_{64}H_{114}N_{14}O_{12}$, **Figure 1**), neutre et lipophile (18). Sa composition cyclique est stabilisée par de l'huile de castor avant d'être diluée dans un mélange d'alcool et d'huile végétale (olive, maïs, ricin ou lin) pour son utilisation clinique. Il existe quatre formes galéniques : capsules molles, solution buvable, solution injectable et collyre. Les formes utilisées en transplantation rénale sont les trois premières.

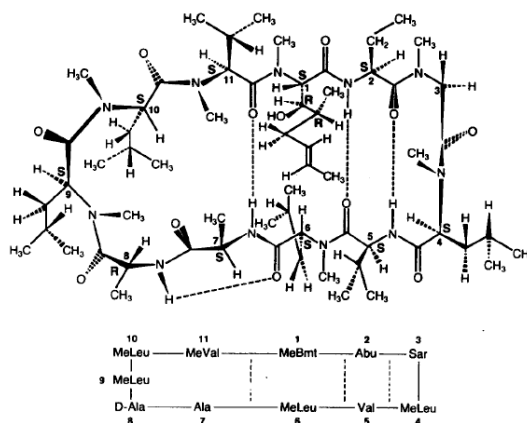


Figure 1. Structure de la ciclosporine tiré de Christians & Sewing (19).

La forme cyclique de la ciclosporine lui donne son nom et la rend difficilement soluble dans l'eau.

Après une administration *per os*, la biodisponibilité intraveineuse est de 30% environ (18). L'absorption par voie digestive dépend principalement de la capacité d'extraction de la

protéine d'efflux Pgp (P-glycoprotein) (**Figure 2**) : malgré le gradient entre la lumière digestive et la lumière vasculaire, elle transporte la ciclosporine du cytosol vers la lumière digestive (20).

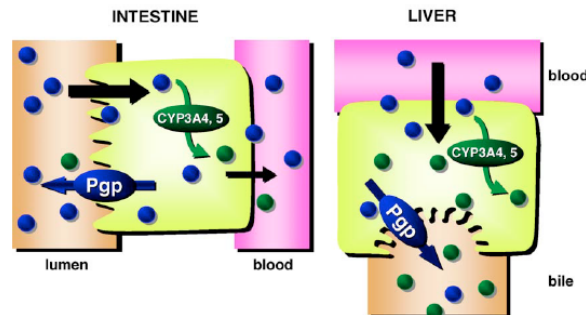


Figure 2. Métabolisme digestif de la ciclosporine tiré de Masuda & Inui (20).

Les points bleus représentent la forme inchangée et les points verts les métabolites de la ciclosporine.

La ciclosporine est absorbée par voie intestinale et transcellulaire. En intracellulaire, les isoformes 3A4 et 3A5 du cytochrome P450 (respectivement CYP3A4 et CYP3A5) transforment la ciclosporine en métabolites inactifs ; la P-glycoprotein (Pgp) permet d'accélérer la sortie au pôle apical de la ciclosporine et de ses métabolites. Une partie du métabolisme de la ciclosporine se produit dans les entérocytes (au niveau intestinal) et une autre dans les hépatocytes (au niveau hépatique).

L'élimination de la ciclosporine et de ses métabolites se produit principalement dans les selles : soit directement dans la lumière digestive (par les entérocytes) soit d'abord dans la bile (par les hépatocytes).

Une fois dans la circulation, la ciclosporine est rapidement liée aux lipoprotéines et aux membranes cellulaires (**Figure 3**) (18). Elle est ensuite métabolisée (principalement dans le foie mais aussi dans tous les tissus) par l'isoforme 3A (essentiellement les sous-classes 4 et 5) du cytochrome P450 (21) pour être éliminée dans les selles (**Figure 2**). Les CYP3A4 et CYP3A5 dégradent la ciclosporine en une trentaine de métabolites dont l'activité anticalcineurine n'est pas certaine (20).

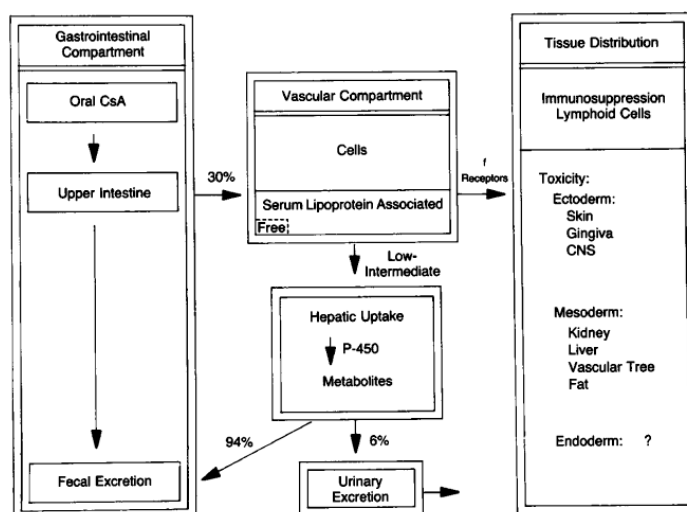


Figure 3. Métabolisme de la ciclosporine tiré de Kahan (18).

L'absorption intestinale de la ciclosporine représente environ 30 % de la dose administrée par voie orale. Son caractère lipophile lui permet d'être rapidement disponible en intracellulaire dans la quasi totalité des tissus de l'organisme. Son métabolisme est principalement hépatique avec une élimination dans les selles.

Chez l'Homme, le pic d'activité anticalcineurine est obtenu au bout d'une heure après la prise orale de ciclosporine (22). L'aire sous la courbe (ou AUC, Area Under the Curve) de ciclosporinémie est associée à un risque plus élevé de rejet lorsqu'elle est basse et à un risque plus élevé de toxicité lorsqu'elle est augmentée (23). Compte tenu qu'il n'est pas pratique en routine de doser l'AUC (qui nécessite différents points de prélèvements sanguins à plusieurs heures d'intervalle), le dosage à la deuxième heure (C2) est celui qui doit être préféré (24) puisqu'il est le plus associé à l'AUC et permet donc de prédire le risque de rejet et celui de toxicité lié à l'exposition à la ciclosporine (25). Il nécessite cependant un nouveau prélèvement et c'est la résiduelle (C0) qui est parfois utilisée en pratique clinique.

Mécanismes d'action de la ciclosporine

La ciclosporine s'associe principalement à la cyclophiline A dans le cytoplasme des leucocytes (essentiellement des lymphocytes T mais aussi des lymphocytes B et des mastocytes) (26). Ce complexe ciclo-cyclophiline A s'associe à la sous-unité catalytique A de la calcineurine (CaN) (27). La CaN ne peut plus alors déphosphoryler les molécules de la famille des NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells) qui, une fois transloquées dans le

noyau (**Figure 4**), agissent comme des facteurs de transcription notamment pour les gènes codant pour l'interleukine 2 (IL-2) et l'interleukine 4 (IL-4) qui sont des facteurs de prolifération et de différenciation des lymphocytes T activés (28).

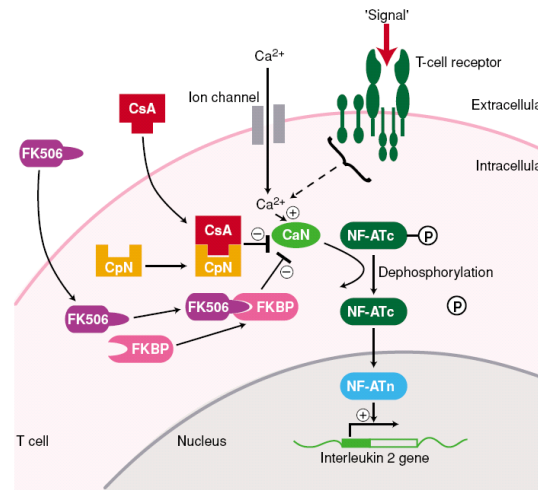


Figure 4. Mécanisme d'action des anticalcineurines tiré de Stepkoswki (26).

CsA : ciclosporine ; FK506 : tacrolimus ; CpN : cyclophiline ; FKBP : FK506 Binding Protein ; CaN : calcineurine ; NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells). La ciclosporine se lie à la cyclophiline dans le cytoplasme. Le complexe ciclosporine-cyclophiline inhibe l'activité phosphatasique de la calcineurine. Les molécules cytosoliques de la famille des NF-AT (NF-ATc) ne sont alors pas transférées dans le noyau (NF-ATn) puisqu'elles doivent être déphosphorylées pour être transloquées. Dans le noyau des lymphocytes T, ces molécules sont des facteurs de transcription, notamment du gène codant pour l'interleukine 2.

Au cours du mécanisme de rejet de greffe, les cellules présentatrices d'antigènes activent les lymphocytes T *via* plusieurs signaux. La ciclosporine inhibe le premier signal qui est celui qui active la CaN, responsable de la prolifération cellulaire et la synthèse d'interleukine 2 qui elle-même participe à l'activation du troisième signal de façon autocrine sur son récepteur membranaire (**Figure 5**, (8)).

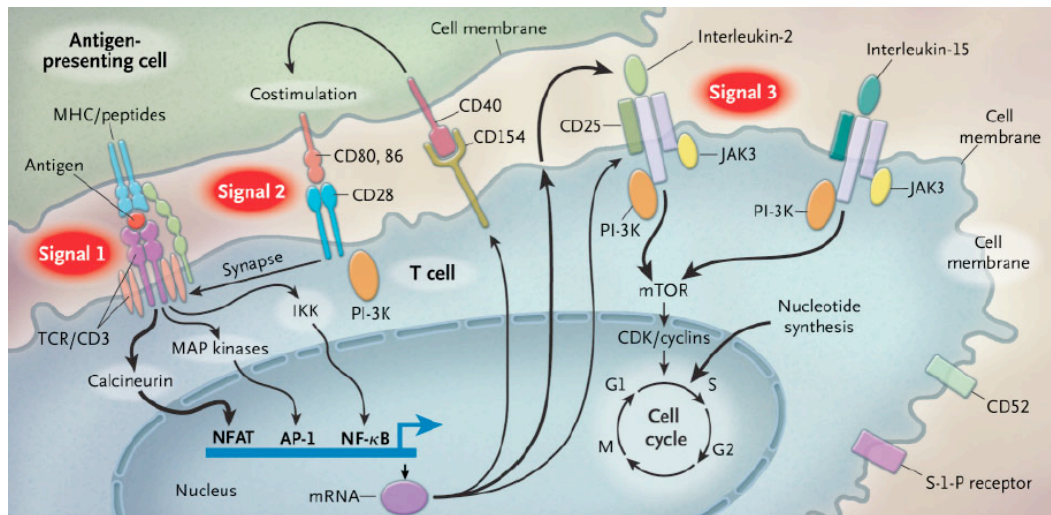


Figure 5. Activation lymphocytaire tiré de Halloran (8).

La cellule présentatrice d'antigène (par exemple, un macrophage résident) induit trois signaux lors de l'activation de la cellule immunitaire effectrice (le lymphocyte T) : le premier signal implique l'antigène présenté et le récepteur des cellules T (TCR/CD3) ; le TCR active en particulier la voie calcineurine-dépendante.

Ciclosporine et Tacrolimus

Le tacrolimus a été découvert plusieurs années après la ciclosporine par une équipe japonaise à partir d'une bactérie (*Streptomyces tsukubaensis*) : il présente une structure de type macrolide neutre et a les mêmes propriétés immunosuppressives inhibitrices sur la production d'IL-2 par les lymphocytes T que la ciclosporine (29). Dans le cytosol, il se lie à une autre cyclophilline, la FKBP, pour inhiber la CaN et ainsi la déphosphorylation de NF-AT (**Figure 4**).

Même si le tacrolimus et la ciclosporine partagent des propriétés immunosuppressives équivalentes *via* la même voie de signalisation dépendante de l'inhibition des sous-unités A et B de la CaN, leurs interactions sont légèrement différentes (**Figure 6**) : parmi les 25 résidus de la CaN impliqués dans l'interaction CpN-Ciclosporine et CaN, 20 sont communs à l'interaction FKBP-Tacrolimus et CaN (30). Cette grande homologie d'interaction moléculaire explique probablement que ces deux anticalcineurines présentent une grande homologie d'effets.

Compte tenu de sa conformation cyclique, le tacrolimus est lui aussi insoluble dans l'eau et diffuse, comme la ciclosporine, très bien dans les lipides (31).

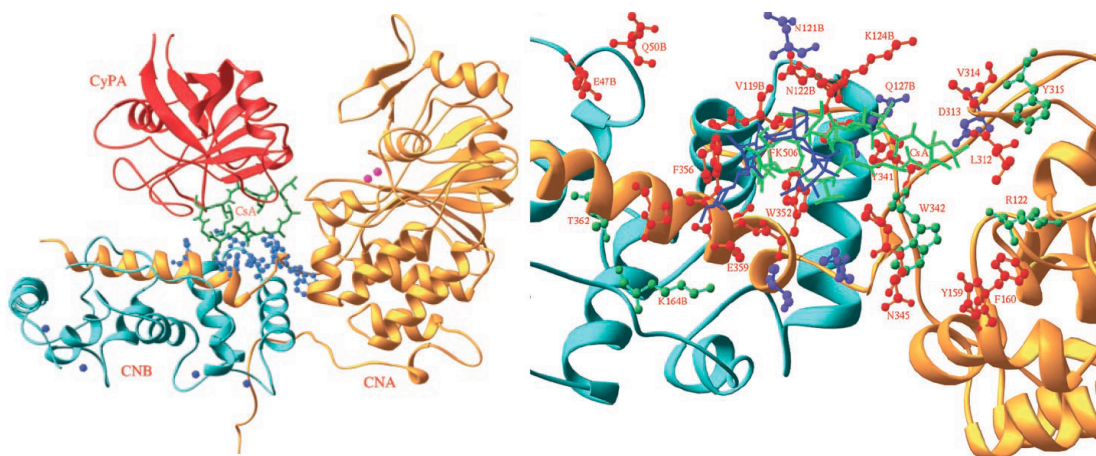


Figure 6. Interactions anticalcineurines-cyclophillines-calcineurine représentées par cristallographie tirée de Huai *et al.* (30).

Le panneau de gauche représente les interactions entre la ciclosporine (CsA, en vert) avec la cyclophiline A (CyPA en rouge) et les sous-unités catalytiques A (CNA en jaune) et B (CNB en cyan) de la calcineurine. A droite, le tacrolimus (FK506, bâtons bleus) et la ciclosporine (CsA, bâtons verts) partagent les mêmes interactions avec certains résidus (en rouge) des sous-unités catalytiques A (en jaune) et B (en cyan) de la calcineurine alors que la ciclosporine a des interactions propres avec certains autres résidus (en vert), tout comme le tacrolimus (en bleu).

Utilisations cliniques de la ciclosporine

La ciclosporine a révolutionné le traitement mais aussi la durée de vie des transplants. La découverte de ses effets immunosuppresseurs en 1976 l'a rapidement amenée à être testée chez la souris au cours de maladies impliquant le système immunitaire (32). La première étude pilote chez l'Homme a eu lieu en transplantation rénale avec de fortes doses (25mg/kg/j) (7). Par la suite, l'intérêt de la ciclosporine a été démontré non seulement pour la transplantation rénale (33) mais aussi pour la transplantation cardiaque (34), hépatique (35), cardio-pulmonaire (36) et pulmonaire seule (37). La ciclosporine n'a pas démontré son intérêt que chez les adultes : depuis 30 ans, elle est aussi utilisée en pédiatrie pour la transplantation rénale (38), hépatique (39) ou cardiaque (40).

Enfin, la ciclosporine est utilisée dans de nombreuses maladies dysimmunitaires (10) : elles peuvent être rénales comme dans le syndrome néphrotique secondaire à des lésions glomérulaires minimes (46) ou des lésions de hyalinose segmentaire et focale (47) ou extra-rénales comme l'uvéïte (48) et dans les arthrites inflammatoires, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou le psoriasis (49) principalement par voie systémique mais aussi par voie locale (en topique)...

Au total, même si elle a tendance à être remplacée par le tacrolimus dans certains pays, la ciclosporine reste un traitement largement utilisé.

17

Effets indésirables

Les effets indésirables de la ciclosporine peuvent être divisés en effets liés à son activité d'immunosuppresseur et ceux liés à ses effets non immunosuppresseurs.

Au cours de l'immunosuppression, les patients traités par ciclosporine peuvent présenter plus fréquemment des infections (bactériennes, virales, parasitaires ou fongiques) et des cancers principalement cutanés et hématologiques : le rôle spécifique de la ciclosporine dans la survenue et/ou la progression des tumeurs reste débattu et peut être associé à la production de TGF β qu'elle induit (50). Les effets non immunosuppresseurs sont représentés par une atteinte endocrinienne (hirsutisme, dyslipidémie et intolérance au glucose pouvant aller jusqu'au diabète), une hypertrophie gingivale ainsi qu'une neurotoxicité et une toxicité hépatique (51) mais l'effet le plus redouté est l'atteinte rénale (hypertension artérielle, hyperkaliémie et néphrotoxicité).

Effets indésirables extra-rénaux

L'hirsutisme n'est pas la complication la plus grave du traitement par ciclosporine mais apparaît dans environ 5% des cas (52). Cet effet est probablement en rapport avec une action spécifique sur le cycle cellulaire des kératinocytes (53).

La dyslipidémie quant à elle survient dans environ 9% des cas et dès le premier mois de traitement (52) : il peut apparaître une augmentation du cholestérol total avec une augmentation des LDL (Low-Density Lipoprotein), une diminution des HDL (High-Density Lipoprotein) et une augmentation des triglycérides. Les mécanismes expliquant les dyslipidémies sous ciclosporine sont encore mal compris mais impliquent la formation des acides biliaires, la fixation de la ciclosporine sur le récepteur des LDL et une action sur les lipases hépatiques (54).

La survenue d'une intolérance au glucose (voire même d'un diabète *de novo*) est difficile à évaluer compte tenu de l'utilisation concomitante (et/ou préalable) très fréquente de corticostéroïdes (eux-mêmes très pourvoyeurs de diabète) dans les situations cliniques où la ciclosporine est nécessaire (55). Elle implique probablement une résistance périphérique à l'insuline ainsi qu'un défaut de production d'insuline par les cellules de Langerhans pancréatiques (56).

L'hypertrophie gingivale est désormais un effet indésirable assez rare (<5% des patients) depuis la diminution des doses de ciclosporine (52). Sa physiopathologie est elle aussi mal connue mais inclue probablement des effets inflammatoires locaux (57) voire infectieux et des effets pro-angiogéniques (58).

Les tremblements fins des extrémités sont un des effets indésirables classiques en cas de surdosage en inhibiteurs de la calcineurine mais ne surviennent que chez environ 4% des patients transplantés rénaux sous ciclosporine (52). Une étude récente par électro-neuromyogramme suggère que les patients traités par ciclosporine présentent une augmentation de l'excitation des nerfs périphériques par augmentation de la dépolarisation membranaire (59). Les autres effets neurotoxiques de la ciclosporine sont encore plus rares et sont présents principalement à la phase aiguë du traitement (à l'initiation lorsque les doses sont assez souvent élevées) et peuvent aller jusqu'à des convulsions voire une encéphalopathie postérieure (60) dont on ne sait si elle n'est pas due à l'hypertension artérielle induite par la ciclosporine (61).

La toxicité hépatique de la ciclosporine est connue depuis sa première utilisation en transplantation rénale (7). Elle se manifeste principalement par des modifications biologiques comme une hyperbilirubinémie et/ou une cytolyse hépatique (avec aminotransférasémie) mais survient dans moins de 3% des cas (52) et n'entraîne jamais d'insuffisance hépatocellulaire.

A mi-chemin entre les complications extra-rénales et les complications rénales, se situe l'hypertension artérielle systémique associée à la ciclosporine. En effet, évaluer l'implication de la ciclosporine dans la survenue d'une hypertension artérielle systémique après transplantation rénale est difficile : les patients ont souvent un long passé d'hypertension artérielle, ils présentent également une insuffisance rénale chronique, une rétention sodée ainsi que d'autres traitements pouvant eux-mêmes induire une hypertension artérielle. Cependant, une récente méta-analyse a mis en évidence un effet spécifique de la ciclosporine : pour des posologies usuelles (1 à 4 mg/kg/j), les patients présentent une augmentation de pression artérielle moyenne d'environ 5mmHg quelle que soit l'indication (62). Sa physiopathologie est mal connue mais implique probablement trois voies (63) : une augmentation de la vasoconstriction *via* l'angiotensine II, l'endothéline et le système nerveux sympathique, une diminution de la vasodilatation *via* une diminution du monoxyde d'azote (NO) et une augmentation de la réabsorption de sodium (63). La toxicité vasculaire de la ciclosporine est détaillée plus loin dans un chapitre spécifique (cf. p. 23 Vasculotoxicité de la

ciclosporine) et les effets sur les transports ioniques au sein de l'épithélium rénal sont eux aussi abordés dans un chapitre spécifique (cf. p. 22 Tubulopathie toxique).

Néphrotoxicité de la ciclosporine

Classiquement, la néphrotoxicité de la ciclosporine est divisée en néphrotoxicité aiguë dite réversible et en néphrotoxicité chronique dite irréversible. Cette classification est cependant débattue : certaines des lésions dites « aiguës » peuvent être irréversibles. Histologiquement, la toxicité peut se manifester par des vacuolisations tubulaires (tubulopathie toxique), une artériolopathie hyaline et même des lésions de micro-angiopathie thrombotique à la phase aiguë (64) ainsi qu'une artériolopathie hyaline avec glomérulosclérose, fibrose interstitielle en bande et atrophie tubulaire à la phase chronique (65). Les vacuolisations tubulaires sont classiquement isovolumétriques et peuvent être le résultat d'un élargissement du réticulum endoplasmique et des lysosomes (64) ou de tout autre endosome, voire même des vacuoles d'autophagie (66).

La toxicité chronique est une complication fréquente du traitement : elle touche 50% des transplantés rénaux à 5 ans et jusqu'à 100% des transplantés rénaux à 10 ans dans certaines études (67). La hyalinose artériolaire semble être la résultante d'une nécrose des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) entraînant une transformation éosinophilique puis une vacuolisation des CMLV et enfin des dépôts hyalins (64). L'atrophie tubulaire et la fibrose interstitielle semblent être la résultante d'une ischémie chronique avec la production de radicaux libres et de ROS (Reactive Oxygen Species) qui entraînent la mort cellulaire (68). La toxicité rénale chronique de la ciclosporine s'accompagne d'une dégradation lente de la fonction rénale, entrant dans la définition de la dysfonction chronique du transplant.

La toxicité tubulaire de la ciclosporine peut se diviser arbitrairement en deux parties (régulièrement en interaction) : une atteinte des transports ioniques et une atteinte toxique dit « pure ». La première entraîne des désordres hydro-électrolytiques (comme l'hyperkaliémie, la rétention sodée, l'acidose métabolique, l'hyperuricémie, l'hypercalciurie et l'hypomagnésémie) et la seconde peut conduire à la fibrose et l'insuffisance rénale *via* des vacuolisations tubulaires et la Transition Épithélio-Mésenchymateuse (TEM).

Désordres hydro-électrolytiques

L'implication de la rétention hydrosodée au cours de l'augmentation de la pression artérielle systémique lors d'un traitement par ciclosporine a été mise en évidence la première fois par Curtis *et al.* (69) : les patients traités par ciclosporine présentaient une diminution de leur pression artérielle lors d'une restriction sodée et augmentait avec l'augmentation de la ration sodée, ce qui n'était pas le cas de patients traités par azathioprine. La rétention hydrosodée et l'hyperkaliémie semblent associées chez les patients traités par ciclosporine. Non seulement il existe une résistance aux diurétiques de l'anse (70) mais l'hyperkaliémie induite/favorisée par la ciclosporine peut découler en partie d'une activation du cotransporteur sodium-chlore (NCC) : la ciclosporine induit une augmentation de la synthèse et de l'expression de la serine/threonine protéine kinase WNK4 qui augmente la phosphorylation de NCC, donc son activité (71). Le mécanisme semble similaire pour le tacrolimus (72). De plus, l'hyperkaliémie peut être expliquée en partie par l'acidose métabolique induite par la ciclosporine (73) : une atteinte du néphron distal (74) semble être secondaire à une action sur la pompe Na^+/K^+ ATPase dans cette partie du tubule rénal (75). Chez le rat, cette acidose métabolique a été démontrée comme étant une acidose tubulaire distale (76) : elle est due à une inhibition de la sécrétion de bicarbonates en raison d'une inactivation de la cyclophilline par la ciclosporine dans les cellules intercalaires du canal collecteur (77). La ciclosporine a aussi un effet sur l'activité des canaux potassiques (comme ROMK) *via* son inhibition de la phosphatase 2B (ou CaN, (78)). Enfin, l'hyperkaliémie et l'acidose métabolique peuvent être expliquée par une part d'hypo-réninisme lors d'un traitement par ciclosporine (79) : les effets de la ciclosporine sur le Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) sont détaillés plus loin (cf. p. 33 Ciclosporine et Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone).

Par ailleurs, la ciclosporine entraîne une hyperuricémie chez plus de 80% des patients qui se complique dans environ 10% des cas par des crises de goutte (80). L'hyperuricémie est due à une diminution de la fraction excrétée d'acide urique qui est liée à une diminution de la charge filtrée et/ou une atteinte de la micro-vascularisation rénale induite par la ciclosporine plutôt qu'à une atteinte directe du transport transépithélial de l'acide urique (81).

L'hypomagnésémie est une des complications du traitement par ciclosporine : elle est associée à une perte de fonction rénale (82). Sa physiopathologie est complexe : elle implique probablement un défaut de réabsorption du magnésium au niveau de l'anse de Henle *via* un défaut d'expression de paracelline (83) et/ou un défaut d'expression de TRPM6 au niveau du

tube contourné distal (84). Chez les patients transplantés rénaux, la fraction excrétée de magnésium est augmentée sous ciclosporine et est associée à une diminution de l'expression de l'EGF (Epidermal Growth Factor) : la ciclosporine induirait une diminution de la synthèse d'EGF par les cellules rénales, ce qui induirait une diminution de l'activation de TRPM6 et donc une diminution de la réabsorption de magnésium (85).

Tubulopathie toxique

Dès la première utilisation de la ciclosporine à fortes doses, Calne *et al.* ont observé des lésions de toxicité tubulaire pouvant être dues à la ciclosporine : vacuolisations et nécrose tubulaire étaient décrites pour la première fois (7). En fait, au cours de la néphrotoxicité aiguë de la ciclosporine, différentes étapes peuvent se voir : de la disparition de la bordure en brosse de l'épithélium du tube contourné proximal à des lésions de nécrose tubulaire aiguë en passant par des vacuolisations cytoplasmiques (classiquement isovolumétriques) (51). En microscopie électronique, il a été montré que ces vacuolisations sont probablement issues des organites intracellulaires comme les lysosomes, le réticulum endoplasmique et/ou les mitochondries (64). Deux phénomènes principaux semblent impliqués : le stress du réticulum endoplasmique (86) et son adaptation, l'autophagie (87). Ceci peut être dû soit à un effet direct toxique de la ciclosporine sur les cellules épithéliales soit à une hypoxie cellulaire (88). Le stress du réticulum endoplasmique conduit à des modifications phénotypiques des cellules épithéliales tubulaires rénales proches de la TEM (89) : ces cellules épithéliales rénales expriment des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la β -caténine (90) ainsi que des marqueurs pro-inflammatoire comme l'ostéopontine et pro-fibrosants comme le TGF β (91). Ces marqueurs de TEM peuvent permettre de prédire la néphrotoxicité de la ciclosporine (92) même à un stade réversible (90). En transplantation, la TEM est probablement un des acteurs forts conduisant à la fibrose et à la perte de transplant à long terme (93).

Vasculotoxicité de la ciclosporine

Dès les premières études sur la néphrotoxicité de la ciclosporine, un profil particulier a été mis en évidence : après un traitement par ciclosporine, une diminution aiguë du débit de filtration glomérulaire apparaît mais sans dysfonction tubulaire. Cet effet étant rapidement réversible, l'hypothèse retenue est une vasoconstriction de l'artériole afférente (94). En effet, lors d'un traitement par ciclosporine, il existe une modification du flux sanguin rénal qui s'accompagne d'une vasoconstriction glomérulaire (surtout au niveau de l'artériole afférente mais aussi efférente) (95) authentifiée par une diminution du calibre de l'artériole afférente et ceci sans dysfonction tubulaire (96) (**Figure 7**). Par ailleurs, il est aussi apparu que les lésions de toxicité chronique liées à la ciclosporine pouvaient être associées au maintien de cette vasoconstriction non seulement sur l'artériole afférente mais aussi au niveau de la vascularisation tubulo-interstitielle (entraînant une diminution du débit sanguin dans les capillaires péri-tubulaires et une fibrose interstitielle en bande) (97). La vasculotoxicité de la ciclosporine apparaît donc comme un des déterminants principaux de sa néphrotoxicité à la fois aiguë et chronique.

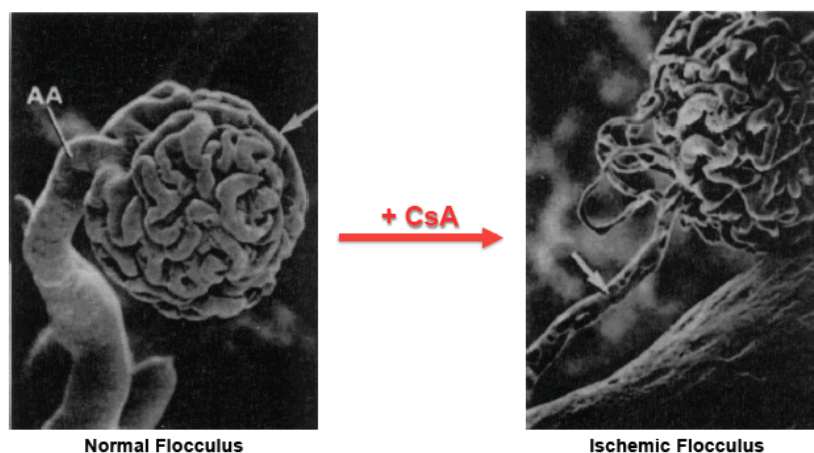


Figure 7. Vasoconstriction induite par la ciclosporine tiré de English *et al.* (96).

CsA : ciclosporine. Le flocculus est la partie vasculaire du glomérule. L'artériole afférente (AA) est la source de la perfusion glomérulaire. Lors de l'administration de ciclosporine, une vasoconstriction intense de l'artériole afférente survient, induisant ainsi une rétraction du flocculus.

De plus, au cours d'un modèle étudiant des artères mésentériques de rat, la ciclosporine induit une hyper-contractilité de la CMLV en augmentant l'entrée intracellulaire de calcium (68, 98). L'étude d'aortes isolées de rats montre que la ciclosporine induit aussi une dysfonction de la cellule endothéliale (CE) et augmente la réponse vasoconstrictrice à

l'angiotensine II (68, 99). Il existe donc un effet de la ciclosporine à la fois sur les CMLV et sur les CE.

Sur le plan moléculaire, l'hypothèse principale est une dérégulation de la production et/ou l'activité de facteurs vasoactifs : une augmentation de facteurs vasoconstricteurs (comme l'endothéline et les agents du SRAA) et une diminution de facteurs vasodilatateurs (comme le NO ou la cyclooxygénase-2, COX-2) (64, 100). L'endothéline, en tant qu'agent vasoconstricteur, semble jouer un rôle important (101) : non seulement les cellules épithéliales rénales sont capables de sécréter de l'endothéline après un traitement par ciclosporine (102) mais l'endothéline entraîne aussi une vasoconstriction rénale (103) et une dysfonction glomérulaire (104) après un traitement par ciclosporine. L'effet de l'endothéline sur la vasoconstriction glomérulaire prédomine sur l'artériole afférente par rapport à l'artériole efférente (105). Par ailleurs, l'endothéline induit une sécrétion compensatrice de COX-2 (agent vasodilatateur) *via* une voie NFAT-dépendante qui est donc bloquée sous ciclosporine : l'effet vasoconstricteur de l'endothéline serait donc amplifié par la ciclosporine (106). Enfin, il a été montré que RGS4 (une protéine régulatrice des protéines G associées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires, notamment ceux de l'endothéline et de l'angiotensine II) jouait un rôle au cours des effets vasomoteurs de la ciclosporine : les souris invalidées pour RGS4 présentent une susceptibilité accrue au développement d'une néphrotoxicité de la ciclosporine accompagnée d'une diminution plus importante du débit sanguin rénal que les souris contrôles (non invalidées pour RGS4) ; ces effets sont réversibles lors d'un traitement par un antagoniste des récepteurs A et B de l'endothéline, le bosentan (107).

La ciclosporine augmente également la production de radicaux libres comme le peroxy-nitrite (108) qui sont des agents vasoconstricteurs (109) responsables d'une hypoxie tissulaire (110). Au-delà de la COX-2, d'autres agents vasodilatateurs sont aussi atteints : lors d'un traitement par ciclosporine, la production de NO par la NO Synthase endothéliale (eNOS) est diminuée (111). De plus, la biodisponibilité locale du NO est altérée par la production de radicaux libres locaux, altérant ainsi encore la vasodilatation (109).

Sur le plan cellulaire, la ciclosporine induit une prolifération des CMLV et augmente l'adhésion des monocytes aux CMLV (112) ainsi que d'autres leucocytes aux CE *via* I-CAM1, V-CAM1 et E-selectine (113). Elle inhibe la sécrétion de la NO Synthase inductible (iNOS) par les CMLV et diminue ainsi la production de NO (114) : il y a donc une inhibition

de la vasodilatation. La ciclosporine agit aussi sur le métabolisme du calcium : elle augmente l'entrée intracellulaire (depuis le secteur extracellulaire) du calcium et potentialise donc la contraction des CMLV (98) par l'augmentation de l'activité du canal calcique voltage-dépendant de type L (115, 116). En plus de cet effet, les CMLV incubées en présence de ciclosporine ont une réponse aux agents vasoconstricteurs augmentée : en présence de ciclosporine, des CMLV en culture libèrent une quantité plus importante de calcium depuis les compartiments de stockage intracellulaires tout en augmentant le nombre de récepteurs membranaires à l'arginine vasopressine (agent vasoconstricteur) sans en modifier leur affinité (117).

Enfin, le système nerveux autonome semble impliqué au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine : chez le rat, après un traitement par ciclosporine, il existe une rétention sodée associée à une augmentation de l'activité sympathique afférente et efférente rénale (118) ainsi qu'une hypertension artérielle systémique (119). Toujours chez le rat, cet effet est associé à une diminution du débit sanguin rénal et une augmentation des résistances vasculaires rénales mais n'est pas modifié par l'administration de captopril (un Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion, IEC) (120). En revanche, si cela est sans doute vrai pour les reins natifs, ces effets ne sont pas vérifiés lorsque les reins sont dénervés (118, 121), ce qui est le cas au cours de la transplantation rénale (122). Si l'effet est observé sur la pression artérielle, il semble dose-dépendant et associé à la sécrétion concomitante de rénine (120). Enfin, la modification du débit sanguin rénal associée à l'innervation rénale sympathique n'est pas observée dans tous ces modèles murins (118).

Au total, la néphrotoxicité de la ciclosporine semble intimement liée à sa vasculotoxicité. L'ensemble des facteurs agissant sur la vasomotricité semble impliqué, notamment les voies de l'endothéline et du NO. Par ailleurs, un des acteurs importants de la vasomotricité est le SRAA dont l'effecteur final est le récepteur de l'aldostérone.

Minéralocorticoïdes en physiopathologie

L'hormone minéralocorticoïde (aldostérone) est synthétisée par la zone glomérulée de la glande surrénalienne. Elle participe au contrôle de la réabsorption rénale de sodium et joue ainsi un rôle majeur dans la régulation de la volémie et de la pression artérielle. L'hormone exerce ses effets dans le néphron distal *via* le RM, un récepteur nucléaire qui agit comme un facteur de transcription ligand-dépendant (123).

Le Récepteur Minéralocorticoïde et ses ligands

Le RM est codé par le gène NR3C2 situé sur le bras long du chromosome 4 : il est composé d'environ 450 paires de bases comprenant 10 exons (124). La protéine synthétisée comporte 984 acides aminés (**Figure 8**). En tant que membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, le RM possède trois régions principales d'activité : une région N-terminale (NTD ou N-Terminal Domain) suivie par une région centrale de liaison à l'ADN (DBD ou DNA-Binding Domain) et une région C-terminale de liaison du ligand (LBD ou Ligand-Binding Domain).

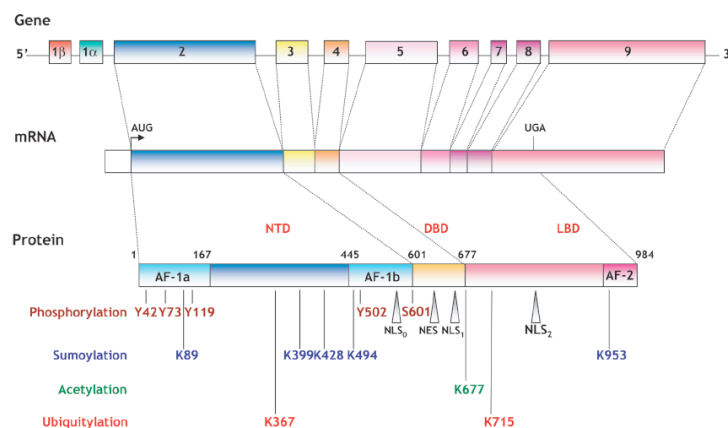


Figure 8. Représentation schématique du Récepteur Minéralocorticoïde (gène, ARNm et protéine) tiré de Viengchareun *et al.* (124)

Le gène codant pour le Récepteur Minéralocorticoïde est composé de 10 exons : seuls les 8 derniers codent pour l'ARN messenger (mRNA). La protéine est composée d'une région N-terminale (NTD), d'une région de liaison à l'ADN (DBD) et une région de liaison du ligand (LBD). Elle peut subir des modifications post-traductionnelles : phosphorylation, sumoylation, acétylation et ubiquitylation.

Le ligand « naturel » du RM est l'aldostérone : une hormone synthétisée par la zone glomérulée de la glande surrénalienne. L'aldostérone est l'hormone terminale du SRAA :

cette cascade a pour rôle principal de contrôler la pression artérielle et la volémie. L'angiotensinogène synthétisé par le foie est clivé par la rénine (synthétisée par l'appareil juxta-glomérulaire dans le rein) en angiotensine I. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (synthétisée principalement dans les vaisseaux) va transformer l'angiotensine I en angiotensine II qui stimule la sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée de la surrénale (**Figure 9**). Sa synthèse et sa sécrétion sont régulées par l'angiotensine II, l'ACTH et la kaliémie (124).

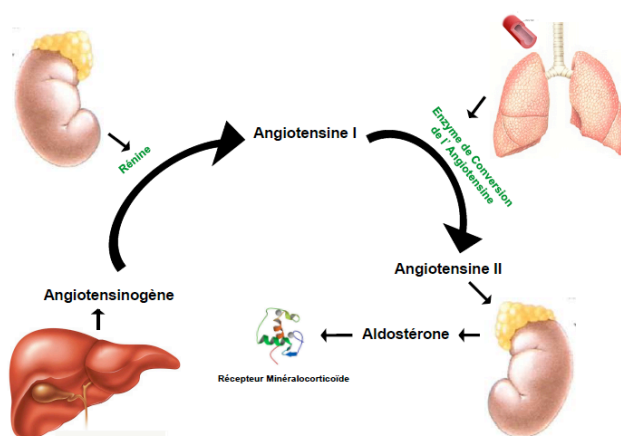


Figure 9. Le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.

L'angiotensinogène (produit par le foie) est clivé par la rénine (produite par le rein) en angiotensine I qui est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (produite par les vaisseaux) en angiotensine II qui induit la sécrétion d'aldostérone (par les surrénales).

Le RM peut lier d'autres ligands, en particulier ceux de la famille des stéroïdes, notamment les glucocorticoïdes présents en concentration 100 à 1000 fois plus importantes dans le plasma que l'aldostérone (125). L'affinité du RM pour les glucocorticoïdes étant la même que pour l'aldostérone, l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11- β HSD2) permet d'assurer une sélectivité de l'aldostérone pour son récepteur dans les cellules cibles : elle clive les glucocorticoïdes en métabolites présentant une moindre affinité pour le RM (126, 127). Le RM peut aussi lier, avec une moindre affinité, les autres stéroïdes comme les androgènes ou la progestérone (124). Tous ces ligands sont des agonistes du RM : ils entraînent son activation.

Une fois activé, le RM entre dans le noyau : sa région DBD (**Figure 8**) se lie à l'ADN sur des éléments de réponse hormonaux (Hormon Response Element, HRE) présents dans les régions promotrices des gènes cibles du RM (**Figure 10**). Récemment, il a même été montré

que le RM pouvait être activé indépendamment de la présence d'un ligand *via* une Rho GTPase (Rac1) non seulement au cours de pathologies avec protéinurie (128) mais aussi au cours de l'hypertension artérielle systémique (129) pouvant sans doute expliquer par là le bénéfice des antagonistes du RM même en l'absence d'hyperaldostéronisme.

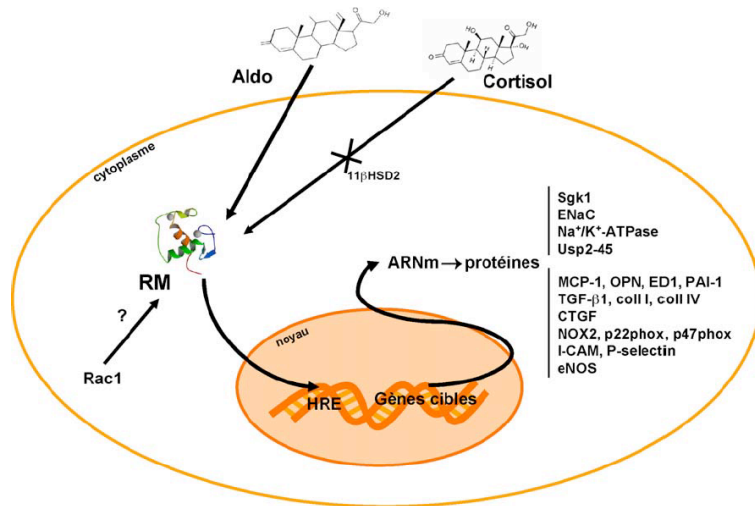


Figure 10. Fonctions cellulaires du Récepteur Minéralocorticoïde tiré de Bertocchio et Jaisser (130)

Le Récepteur Minéralocorticoïde (RM) intracytoplasmique peut lier l'aldostérone (Aldo) ou le cortisol. Le cortisol est rapidement dégradé par l'enzyme 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11-βHSD2). Lorsqu'il est activé, le Récepteur Minéralocorticoïde est transféré dans le noyau et se lie à des zones spécifiques de réponse hormonale (HRE) de l'ADN et induit la transcription de gènes codant pour de nombreuses protéines. Rac1 pourrait activer le Récepteur Minéralocorticoïde en présence ou non d'un ligand.

Le Récepteur Minéralocorticoïde en physiopathologie

Grâce au clonage du RM en 1987 (131), il a été possible de répertorier les tissus où il est exprimé dans l'organisme : il est non seulement présent dans les cellules de l'ASDN mais aussi dans le colon et les glandes sudorales dans lesquelles il exerce son rôle dans le transport vectoriel du sodium et du potassium. Le RM est également exprimé dans des cellules non épithéliales comme les cardiomyocytes, les vaisseaux (CE et CMLV) et les leucocytes circulants (132). L'augmentation de l'expression du RM lui-même est associée à différentes pathologies cardiaques et rénales (133, 134) : l'aldostérone agirait en tant que médiateur dans

certaines pathologies dégénératives comme le remodelage artériel, myocardique ou rénal, indépendamment ou en synergie des effets connus de l'angiotensine II (135).

Le Récepteur Minéralocorticoïde dans les maladies cardiovasculaires

Depuis le début des années 1970, les traitements agissant sur le SRAA ont été la pierre angulaire du traitement des maladies cardiovasculaires : les IEC et les antagonistes du récepteur de l'angiotensine II (ARAI) diminuent de façon significative la survenue de complications cardiovasculaires et la mortalité chez les patients à haut risque cardiovasculaire (136). Ils diminuent notamment le remodelage cardiaque et vasculaire. Cependant, le bénéfice en terme de survie pouvait être amélioré.

Depuis sa découverte en 1960, la spironolactone en tant qu'antagoniste du RM a été indiquée dans les maladies œdémateuses (comme l'ascite), l'hyperaldostéronisme primaire et l'hypertension artérielle essentielle (137). Il faudra attendre 1995 pour qu'elle soit proposée en association aux IEC dans l'insuffisance cardiaque et démontre une efficacité sur la survenue d'arythmies cardiaques lors d'une étude ouverte (138). C'est l'essai RALES qui consacrera l'utilisation des antagonistes du RM au cours de l'insuffisance cardiaque (stade III et IV de la classification NYHA) : cette étude prospective multicentrique randomisée contrôlée en double aveugle contre placebo devra être arrêtée prématurément compte tenu de la survie (critère primaire) nettement supérieure (>30%) chez les patients traités par spironolactone (139). Par la suite, l'éplérénone (un autre antagoniste du RM, dit sélectif et présentant probablement moins d'effets indésirables) a été testée chez les patients présentant une insuffisance cardiaque secondaire à un infarctus du myocarde : l'essai EPHESUS a démontré une diminution de la mortalité toutes causes confondues (critère primaire) de 15% au cours d'une étude prospective multicentrique randomisée contrôlée en double aveugle contre placebo (140). Compte tenu des effets bénéfiques de l'antagonisme du RM au cours de l'insuffisance cardiaque avancée (stades III et IV de la classification NYHA) avec altération de la fraction d'éjection du ventricule gauche, il a été tenté d'étudier l'effet de ces traitements dans les phases précoces de l'insuffisance cardiaque : l'essai EMPHASIS-HF a démontré un effet bénéfique tant sur la mortalité et les hospitalisations pour cause cardiaque (critère primaire) que sur la mortalité toutes causes confondues (critère secondaire) de l'ordre

de 24% au cours d'une nouvelle étude prospective multicentrique randomisée contrôlée en double aveugle contre placebo (141).

Ces études de haut niveau de preuve compte tenu de leur méthodologie et leur reproductibilité n'ont été réalisées que chez des patients présentant une fonction rénale pas ou peu altérée. Récemment, cet effet a aussi été démontré chez les patients insuffisants rénaux terminaux hémodialysés : au cours d'une étude japonaise prospective ouverte randomisée et contrôlée, la spironolactone diminuait le risque de survenue d'événements cérébro-vasculaires (critère primaire : décès et/ou hospitalisations) et de décès toutes causes confondues (critère secondaire) de près de 65% (142). Chez les patients insuffisants rénaux terminaux traités par dialyse péritonéale, au cours d'une autre étude japonaise prospective ouverte randomisée et contrôlée, la spironolactone améliorait significativement la masse ventriculaire gauche (critère primaire) et la fraction d'éjection ventriculaire gauche (critère secondaire) sans augmentation du nombre d'évènements indésirables (143).

Au total, l'antagonisme du RM au cours des maladies cardiovasculaires apparaît comme un traitement de choix : les preuves de son efficacité sur des critères durs (comme la mortalité) plaident en faveur d'une utilisation accrue dans les populations à haut risque cardiovasculaire, notamment les patients insuffisants rénaux chroniques.

Le Récepteur Minéralocorticoïde dans les maladies rénales

Depuis le début des années 1990, le SRAA a été proposé comme une des cibles du traitement des maladies rénales chroniques (144). Rapidement, les IEC ont montré un effet bénéfique sur la progression de l'insuffisance rénale chronique chez les patients diabétiques de type 1 protéinuriques (145). Ces effets ont par la suite été confirmés au cours d'essais prospectifs randomisés et contrôlés contre placebo chez les patients protéinuriques non diabétiques (146, 147). Dès lors, le blocage du SRAA est devenu un des objectifs principaux pour ralentir la progression des maladies rénales chroniques selon les recommandations internationales (148).

En revanche, certains patients présentent secondairement rétention hydrosodée mais aussi d'une augmentation de la protéinurie et probablement d'une dégradation de la fonction rénale. Cet effet, appelé « échappement de l'aldostérone », est caractérisé par une re-

ascension de l'aldostéronémie chez des patients traités par un inhibiteur du SRAA (IEC ou ARAII) : il survient chez environ un tiers des patients (149). Le même effet est aussi observé chez les patients insuffisants cardiaques traités par un inhibiteur du SRAA (150). Un traitement par antagonisme du RM semble indiqué d'un point de vue physiopathologique pour traiter non seulement la surcharge hydrosodée mais aussi les autres effets rénaux de l'aldostérone : ceux qui ne sont pas liés au transport vectoriel de sodium et de potassium dans le rein. En effet, en plus des cellules du néphron distal (ASDN), les cibles rénales de l'aldostérone incluent les cellules mésangiales (151), podocytaires (152) et des vaisseaux rénaux (14). Des effets « non traditionnels » de l'aldostérone ont été rapportés dans le rein, particulièrement dans les atteintes secondaires à l'hypertension artérielle ou le diabète.

Ces éléments ont été discutés dans deux revues qui détaillent l'ensemble des effets expérimentaux de l'aldostérone et des résultats cliniques de l'utilisation des antagonistes du RM au cours des maladies rénales en français (**Annexe 1**) dans le journal *Néphrologie & Thérapeutique* (130) et en anglais (**Annexe 2**) dans le journal *Kidney International* (153) en 2011.

Effets vasculaires du Récepteur Minéralocorticoïde

Les effets des antagonistes du RM semblent au moins en partie indépendants de leurs effets sur la pression artérielle et sur la natriurèse (154). Ceci soutiendrait des effets extra-rénaux liés au RM (155), en tout cas indépendants du transport vectoriel de sodium et de potassium dans l'ASDN. Au cours des pathologies rénales et cardio-vasculaires, l'aldostérone interviendrait de façon indépendante de ses effets hémodynamiques : la vasculopathie liée à l'aldostérone pourrait être un élément clé de ces pathologies (156). Les études menées dans le modèle pharmacologique aldo-sel (associant uni-néphrectomie, charge sodée et hyperaldostéronémie) suggèrent l'implication du SRAA local ainsi que de l'endothéline, le NO, les ROS et l'inflammation (157). La présence du RM dans les vaisseaux a été démontrée par plusieurs équipes non seulement dans les CE (14, 158) mais aussi dans les CMLV (15, 159). Le RM des CE est impliqué dans la régulation de la pression artérielle et la réponse à l'angiotensine II (14). Récemment, le RM des CMLV a été lui aussi impliqué dans la régulation de la pression artérielle (15, 160).

Une des questions essentielles est celle du ligand du RM vasculaire. La présence de la 11- β HSD2 (qui assure la sélectivité du RM pour l'aldostérone, cf. p. 27) est prouvée dans les CE chez l'animal (14) et l'Homme (161). En revanche, si son implication dans les CMLV est prouvée chez le rongeur (14, 162), elle fait encore l'objet de débats en physiopathologie chez l'Homme (16). C'est une des raisons pour lesquelles nous nous sommes principalement intéressés à l'effecteur quel que soit le ligand : le RM.

Le RM des CMLV est impliqué dans la rigidité artérielle et l'adhésion à la matrice extracellulaire : sa stimulation par l'aldostérone induit une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire (160). L'aldostérone est aussi responsable d'une réponse pro-inflammatoire au sein des vaisseaux *via* C-src (163) et par la voie des ROS générés par les CE (164). Par ailleurs, l'aldostérone augmente le nombre de récepteurs de l'angiotensine II présents sur la surface des CMLV (165). L'aldostérone et l'angiotensine II ont un effet synergique : de faibles doses de chacune de ces hormones une fois combinées augmentent la vasoconstriction induite qui pourrait être provoquée par chacune d'elle (166). Enfin, l'aldostérone induit la synthèse d'endothéline (14, 167).

Il existe de plus une altération de la vasorelaxation induite par les CE lors d'une infusion continue d'aldostérone chez le rongeur (168) traduisant une implication du RM endothélial dans les troubles de la relaxation induits par l'aldostérone. Cet effet implique un défaut de synthèse de NO (169), une diminution de l'activité de la G6PD (impliquée dans le stress oxydant intracellulaire) (170), l'EGFR (171) et les prostacyclines (168).

Au total, l'aldostérone et/ou son récepteur ont des effets importants sur la fonction vasculaire *via* des actions à la fois sur les agents vasoactifs (synthèse, nombre de récepteurs, action des récepteurs), sur l'inflammation et le remodelage vasculaire (172).

Ciclosporine et Système Rénine-Angiotensine Aldostérone

Le SRAA semble jouer un rôle dans la toxicité rénale (notamment vasculaire) de la ciclosporine (68, 173). La ciclosporine entraîne non seulement une augmentation de la sécrétion de rénine mais aussi une augmentation de sa synthèse par l'appareil juxta-glomérulaire (174) ce qui entraînerait une hyperplasie de cet ensemble fonctionnel lors d'un traitement chronique par ciclosporine (175). Il y a un recrutement de cellules avec accumulation de rénine au niveau de l'artériole glomérulaire afférente lors d'un traitement par ciclosporine (176). Par ailleurs, l'hyperplasie de l'appareil juxta-glomérulaire et le recrutement précoce de macrophages avec la prolifération d'autres cellules inflammatoires au niveau tubulo-interstitiel sont associés à la hyalinose artériolaire afférente ainsi qu'à la fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire (177). Cependant, il est classique de noter que les patients traités par ciclosporine présentent une activité rénine plasmatique plus basse que les autres (79). L'effet peut être expliqué par le fait qu'il y a une dissociation entre la rénine plasmatique et l'accumulation intra-rénale de rénine sous ciclosporine (178). Un traitement par aliskiren (un inhibiteur direct de la rénine) a récemment été rapporté comme efficace dans le traitement préventif de la néphrotoxicité et l'hypertension artérielle induites par la ciclosporine chez la souris (179). Enfin, même si le tacrolimus n'induit pas d'augmentation de la sécrétion de rénine par les cellules de l'appareil juxta-glomérulaire (180), l'aliskiren prévient aussi les lésions de néphrotoxicité induites par le tacrolimus chez le rat (181).

La rénine n'est pas le seul acteur du SRAA impliqué : il existe non seulement une augmentation de l'expression locale intra-rénale (101) mais aussi une augmentation de la concentration sérique (182) d'angiotensine II sous ciclosporine. Cette augmentation semble être due à une augmentation de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (183). Par ailleurs, en plus de l'augmentation de l'hormone, il y a une augmentation de son récepteur de type 1 sur les CMLV (184) et une augmentation de la réponse vasoconstrictrice médiée par le calcium (185).

L'aldostérone et/ou le RM semblent aussi jouer un rôle important (100) : chez le rat, l'utilisation de spironolactone prévient l'atteinte rénale aiguë imputable à la ciclosporine *via* des facteurs vasoactifs (186). Concernant l'atteinte chronique, toujours chez le rat, la spironolactone prévient la mortalité induite par la toxicité de la ciclosporine (186), la fonction rénale est par ailleurs partiellement préservée (186-188). Au niveau histologique,

l'artériolopathie afférente est prévenue (188) ainsi que la fibrose (187, 188). Au niveau moléculaire, la spironolactone module l'expression de facteurs vasoactifs (186) et de fibrose (188). Ces effets semblent être partagés par les molécules de la même classe thérapeutiques (les antagonistes du RM) puisque la même efficacité a été retrouvée avec un autre antagoniste : l'administration d'éplérénone simultanément à celle de ciclosporine prévient l'augmentation de la pression artérielle, la perte de poids, l'altération de la fonction rénale, la diminution du débit sanguin rénal, l'altération de la clairance du lithium et les lésions histologiques rénales (vacuolisations tubulaires et dépôts vasculaire) (189). Ces effets sont maintenus lorsque le traitement est réalisé pendant une durée nettement plus longue (12 semaines *versus* 2 à 4 semaines habituellement) : l'administration d'éplérénone chez le rat prévient les lésions de glomérulosclérose, la fibrose interstitielle et la diminution de la fonction rénale induite par la ciclosporine (190). Par ailleurs, les lésions de néphrotoxicité chronique pourraient être partiellement réversibles sous l'action de la spironolactone : la fonction rénale, la fibrose tubulo-interstitielle, l'artériolopathie afférente, l'ischémie glomérulaire et l'apoptose étaient réversible après l'instauration desdites lésions (191).

Si quelques études montrent l'intérêt de l'utilisation d'un ARAII (192) ou d'un double blocage par IEC et ARAII (193) chez le rat, à l'heure actuelle, aucune étude chez l'animal n'a été publiée sur le bénéfice d'un traitement par antagoniste du RM au cours de la néphrotoxicité du tacrolimus.

Essais cliniques de limitation de la toxicité rénale de la ciclosporine

Actions sur le traitement immunosuppresseur

Pour limiter la toxicité rénale de la ciclosporine (et/ou du tacrolimus), un des grands principes a été de diminuer la dose : les standards sont passés de 10 à 25mg/kg/j à l'époque des premières publications (7) à des doses autour de 4mg/kg/j adaptées selon les dosages sanguins des patients de nos jours. Par la suite, depuis les années 2000, différentes stratégies ont été proposées : de la non-utilisation dès le moment de la transplantation (« *avoidance* » dans la littérature anglo-saxonne) à la diminution encore plus importante des doses ± en association à une autre molécule (« *minimization* » dans la littérature anglo-saxonne) en passant par le changement plus tardif pour une autre molécule immunosuppressive (« *withdrawal* » dans la littérature anglo-saxonne), le plus souvent un inhibiteur de mTOR (**Figure 5**) (194, 195). Aucun des essais publiés à l'heure actuelle n'a démontré de supériorité d'une ou l'autre des stratégies proposées ci-dessus sur la survie des transplants à long terme.

Deux essais principaux ont étudié la stratégie de « *minimization* » : au cours de l'essai CAESAR, il n'y avait pas de différence en terme de fonction rénale à 3 et 12 mois (196) ; et au cours de l'essai ELITE-Symphony, il n'y avait pas de bénéfice à 12 mois (ni en terme de survie rénale ni en terme de fonction rénale) dans le groupe traité avec « faibles doses de ciclosporine » (197).

Concernant les essais sur la stratégie d'« *avoidance* », la même étude ELITE-Symphony comprenait un bras sans anticalcineurine (comprenant du sirolimus, un inhibiteur de la voie mTOR) : il n'y avait pas de supériorité concernant la survie et/ou la fonction rénale par rapport aux autres bras de l'étude comprenant des anticalcineurines, que ce soit la ciclosporine ou le tacrolimus (197). Au cours de deux autres essais spécifiques, il n'y avait pas de bénéfice sur la survie ou la fonction rénale (198) voire même un risque plus important de rejet aigu dans le groupe non traité par anticalcineurine (199).

Pour ce qui est des études concernant la stratégie de « *withdrawal* », au cours de l'essai CONVERT, le bénéfice sur la fonction rénale à 2 ans n'est observé que dans un sous-groupe de patients, l'étude ayant dû être arrêtée prématurément en raison de la survenue d'un nombre d'effets indésirables très important dans le groupe non traité par anticalcineurine (200). De plus, si l'essai CONCEPT a montré un effet bénéfique sur la fonction rénale à un an

lors d'un traitement par sirolimus par rapport à un traitement par ciclosporine (201) et que cet effet bénéfique semblait être aussi observé au cours de l'essai Spare-The-Nephron, en revanche, il n'est pas confirmé à plus long terme (2 ans) (202). Cette absence d'effet bénéfique semble être confirmée à très long terme : après 15 ans, les patients chez qui la ciclosporine a été arrêtée au bout de 6 mois de transplantation n'ont aucun bénéfice en terme de morbi-mortalité et, même, ceux qui ont présenté un épisode de rejet suite à l'arrêt ont présenté une moins bonne survie du transplant (203).

Enfin, au cours d'une étude rétrospective sur registre, Srinivas *et al.* ont montré que les patients traités sans anticalcineurines présentaient une survie du transplant à long terme plus faible que ceux qui étaient traités par anticalcineurines (204).

Au total, les anticalcineurines restent les traitements de choix pour la survie au long cours des transplants malgré leur néphrotoxicité. Il faut donc trouver un moyen de la minimiser au maximum pour maintenir ces traitements le plus longtemps possible.

Autres actions

En dehors des actions sur les traitements immunosuppresseurs, plusieurs équipes ont proposé une adjonction d'un traitement agissant sur un des mécanismes physiopathologiques de la néphrotoxicité de la ciclosporine afin de la ralentir/limiter (64).

Puisque la néphrotoxicité de la ciclosporine est due en partie à son action vasoconstrictrice notamment sur l'artériole afférente, plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation d'inhibiteurs calciques permettant de limiter cette vasoconstriction : la nifédipine (205), la lacidipine (206) et l'amlodipine (207) permettaient de limiter (voire d'améliorer) la dégradation de la fonction rénale respectivement après 5, 2 et une année que ce soit après transplantation rénale (205, 206) ou après transplantation d'un autre organe solide (207). En revanche, au moins en transplantation cardiaque, il ne semble pas que cet effet bénéfique sur la fonction rénale persiste après 9 années (208). Il faudra attendre 2009 et la méta-analyse de Cross *et al.* pour trancher : les inhibiteurs calciques non seulement préviennent une partie de la perte de la fonction rénale après transplantation mais améliorent aussi la survie du transplant (209). Il faut noter que cette méta-analyse a étudié à la fois des études contrôlées contre placebo et des études contrôlées contre un bras « sans traitement ». Par ailleurs, les

patients inclus dans ces études pouvaient ne pas être traités par ciclosporine mais devaient présenter une hypertension artérielle.

Puisque que la ciclosporine induit un déséquilibre entre agents vasoconstricteurs et agents vasodilatateurs, certaines équipes ont proposé l'utilisation de vasodilatateurs : le misoprostol (un analogue des prostaglandines) semblait améliorer significativement la fonction rénale après 12 semaines (210) mais cet effet a été contredit par une méta-analyse quelques années plus tard (211) ; la L-arginine (en tant que donneur de NO) n'améliorait pas non plus la fonction rénale chez les patients transplantés rénaux sous ciclosporine présentant une dysfonction chronique du transplant (212).

Par ailleurs, l'implication de la vitamine D a été suggérée au cours d'études chez le rongeur (213) : le paricalcitol (un agoniste du récepteur nucléaire de la vitamine D) permettrait de limiter l'inflammation, la TEM ainsi que l'altération de la fonction rénale induites par la ciclosporine. Une étude prospective ouverte randomisée et contrôlée est d'ailleurs actuellement en cours en Norvège (NCT01694160).

Le SRAA jouant un rôle important au cours de la physiopathologie de la néphrotoxicité de la ciclosporine (cf. p. 33 Ciclosporine et Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone), plusieurs auteurs ont proposé l'utilisation d'agents inhibant différentes étapes du SRAA. L'énalapril (un IEC) a permis de limiter l'altération de la fonction rénale induite par la ciclosporine : chez des patients diabétiques de type 1 (sans maladie rénale préexistante et non transplantés), ceux qui étaient traités par ciclosporine et énalapril présentaient un meilleur débit de filtration glomérulaire à 3 mois malgré le fait qu'ils présentaient les mêmes résistances vasculaires rénales que les patients traités par ciclosporine seule (214). Chez des patients transplantés rénaux, le losartan (un ARAII) a permis de diminuer les taux circulants de TGF β (215, 216) et d'endothéline (215) tout en agissant sur l'hémodynamique intra-rénale (216). En revanche, ni les IEC ni les ARAII n'ont démontré leur efficacité à long terme sur la perte de fonction rénale après transplantation : récemment, le losartan (un ARAII) n'a pas démontré son efficacité dans une étude contre placebo sur la fonction rénale et la fibrose induite par la ciclosporine au bout de 5 ans de transplantation rénale (217). Ils ne font pas mieux que les inhibiteurs calciques : au cours de la dernière grande méta-analyse étudiant les derniers essais randomisés sur les traitements antihypertenseurs utilisés en transplantation rénale, les inhibiteurs calciques étaient les seules molécules à améliorer la survie du transplant ainsi que la fonction rénale (qu'elle soit mesurée par radio-isotope ou estimée par la formule

MDRD) ; mieux, les essais comparant les IEC aux inhibiteurs calciques sont en faveur de ces derniers en terme de fonction rénale mesurée et/ou estimée (209).

Récemment, une étude prospective (ancillaire d'une étude randomisée sur l'effet d'un ARAII sur la fonction rénale des patients transplantés) s'est intéressée au SRAA chez ces patients : des taux élevés d'aldostérone semblaient être associés à un risque plus élevé d'insuffisance rénale terminale après transplantation (218). Aucune étude analysant l'intérêt d'un antagoniste du RM au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine n'a été publiée à l'heure actuelle. Seule une étude prospective ouverte non contrôlée chez le patient transplanté rénal protéinurique malgré un double blocage du SRAA (par IEC et ARAII) rapporte une efficacité de l'ajout de spironolactone sur la protéinurie à 6 mois (219).

Objectifs de la thèse

Au total, la ciclosporine est un médicament incontournable en transplantation : elle permet d'améliorer la survie à long terme avec un excellent rapport coût-efficacité. Sa toxicité rénale est son point faible : même si ses mécanismes sont de mieux en mieux compris, ils le sont encore trop peu pour pouvoir proposer des stratégies efficaces dans la limitation de la néphrotoxicité de la ciclosporine. La vasoconstriction apparaît comme un élément central de ces mécanismes. Les autres stratégies d'intervention sur le SRAA étant inefficaces, il est désormais raisonnable de tenter d'intervenir sur l'effecteur final de cette cascade : le RM. Ceci est de plus soutenu par le fait le RM a des effets sur le tonus vasculaire.

L'objet de cette thèse est donc d'étudier l'implication du RM, notamment au niveau vasculaire, au cours d'un modèle murin de néphrotoxicité de la ciclosporine puis de proposer une stratégie thérapeutique utilisant un traitement antagoniste du RM chez les patients transplantés rénaux sous ciclosporine.

Les objectifs de cette étaient les suivants :

- étudier l'implication du RM vasculaire au cours de la néphrotoxicité aiguë de la ciclo
- si le RM vasculaire est impliqué, étudier séparément l'implication du RM des CE et le RM des CMLV
- si au moins un des RM des cellules vasculaires est impliqué, étudier les mécanismes sous-jacents à l'interaction ciclosporine-RM dans les vaisseaux
- tester la sécurité d'emploi d'un antagoniste du RM (l'éplérénone) dans une population à risque : patients transplantés rénaux traités par ciclosporine avec une fonction rénale altérée
- si l'utilisation de l'éplérénone est envisageable dans cette population, étudier des marqueurs intermédiaires pour le développement ultérieur d'une étude d'efficacité des antagonistes du RM au cours de la transplantation rénale sous ciclosporine

Matériel et méthodes

Etude expérimentale

La partie fondamentale de cette thèse a nécessité 1) le développement d'un modèle de néphrotoxicité aiguë de la ciclosporine chez la souris ; 2) son application à des souris transgéniques dont le gène codant pour le RM était spécifiquement invalidé dans les CE ou les CMLV et enfin, 3) l'analyse des mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité de la ciclosporine et les effets bénéfiques des antagonistes du RM au cours de ce modèle.

Modèles animaux

Modèle de néphrotoxicité de la ciclosporine

La première partie de ce travail a été de développer un modèle de néphrotoxicité aiguë de la ciclosporine au sein du laboratoire : au cours de mon master 2 recherche dans le laboratoire d'accueil (2009-2010), j'ai mis au point un modèle de néphrotoxicité aiguë de la ciclosporine à partir des données de la littérature chez la souris (**Tableau I**).

Tableau I. Modèles animaux de néphrotoxicité aiguë de la ciclosporine chez la souris.
M = Mâles ; F = Femelles ; SC = sous-cutanée ; IP = intra-péritonéale.

Auteurs	Référence	Fonds génétique	Sexe	Voie d'administration	Dosage Ciclosporine (mg/kg/j)	Durée (j)	Véhicule	Régime sans sel
Yang <i>et al.</i>	(220)	ICR	M	SC	30	7	Huile d'olive (1mg/kg)	Oui
Alvarez Arroyo <i>et al.</i>	(221)	C57/Bl6	F	SC	50/150	10/18	Huile d'olive	Non
Kim <i>et al.</i>	(222)	ICR	M	SC	30	7	Huile d'olive (1mL/kg)	Oui
Neria <i>et al.</i>	(223)	C57/Bl6	M	SC	250	5		Non
Siedlecki <i>et al.</i>	(107)	C57/Bl6		IP	250	7		Non

Pour établir ce modèle pathologique chez la souris, nous avons choisi initialement d'utiliser la souche de souris FVB/N compte tenu qu'il avait été récemment rapporté que les agressions rénales pouvaient progresser plus rapidement dans ce fonds génétique (224).

Nous avons choisi le protocole suivant : des souris âgées de 8 à 10 semaines nourries avec un régime pauvre en sel (concentration finale de NaCl 0,1%, SAFE, Augy, France) débuté 4 jours avant le début du protocole étaient injectées tous les jours pendant 10 jours par voie sous-cutanée avec une dose de 100mg/kg/j de ciclosporine diluée à partir d'une solution commerciale (Néoral[®], Novartis, Rueil-Malmaison, France) dans du Crémophor EL[®] (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Les souris étaient sacrifiées le 11^{ème} jour par décapitation pour récupérer le plasma, le sérum, les reins (pour analyse morphologique, biochimique et en biologie moléculaire) ainsi que le tibia. Compte tenu de la tolérance de la ciclosporine chez les souris, la durée de 10 jours a été choisie afin d'observer le maximum de toxicité rénale. Un régime pauvre en sel a été utilisé car il favorise la survenue des lésions de toxicité rénale tubulaire de ciclosporine (225) et était en faveur de notre hypothèse de départ : l'implication du SRAA au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine.

Modèles avec antagonisme pharmacologique du Récepteur Minéralocorticoïde

L'effet des antagonistes pharmacologiques du RM au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine a déjà été publié chez le rat (186-191) mais ne l'a jamais été chez la souris. Nous avons donc du adapter les doses d'antagonistes pharmacologiques du RM en fonction de ce que nous avons déjà utilisé chez la souris dans le laboratoire (14).

Trois groupes ont alors été constitués : contrôle (recevant uniquement le véhicule et l'eau de boisson, Ctrl), ciclosporine (recevant la ciclosporine par voie sous-cutanée et l'eau de boisson) et ciclosporine + c (recevant la ciclosporine par voie sous-cutanée et le canrénoate dilué dans l'eau de boisson). Le canrénoate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) est administré dans l'eau de boisson tous les jours jusqu'au sacrifice en commençant 4 jours avant le début des injections de ciclosporine.

Modèles d'invalidation génique

Au sein du laboratoire d'accueil, nous avons développé un modèle d'invalidation génique (Knock-out, KO) ciblée pour le RM dans la CMLV grâce au système Cre/lox : des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Sm22 (exprimé par les CMLV) ont été croisées avec des souris exprimant le RM floxé (**Figure 11**).

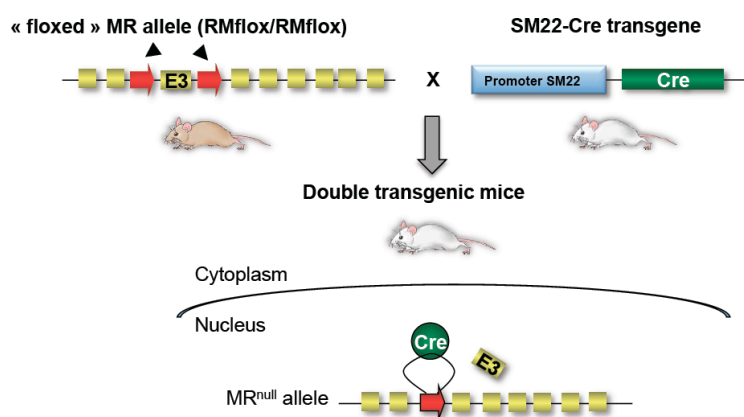


Figure 11. Génération des souris invalidées pour le Récepteur Minéralocorticoïde dans les Cellules Musculaires Lisses Vasculaires.

Une première lignée de souris transgéniques a l'exon 3 (E3) de son gène codant pour le Récepteur Minéralocorticoïde qui est « floqué » : il est marqué en amont et en aval de sa séquence codante. Une deuxième lignée de souris transgéniques exprime la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Sm22. Le croisement des souris de ces deux lignées permet, après plusieurs générations, d'obtenir des descendants homozygotes pour E3 « floqué » plus ou moins hétérozygotes pour la Cre recombinase. En présence de Sm22 dans la cellule (dans les cellules musculaires lisses vasculaires), la Cre recombinase excise E3 floqué : les souris expriment alors une séquence incomplète du gène codant pour le Récepteur Minéralocorticoïde dans les cellules musculaires lisses vasculaires.

L'analyse phénotypique et en biologie moléculaire (par Guillaume Galmiche, post-doctorant dans le laboratoire de 2010 à 2013) a montré une diminution de 50% de l'expression de l'ARNm et de la protéine du RM dans les aortes de ces souris par rapport aux souris contrôles (160). Par ailleurs, en immunohistochimie, le marquage pour le RM est absent au niveau des CMLV chez les souris KO et elles présentent des modifications phénotypiques de leurs fonctions vasculaires (160).

Afin de générer des souris invalidées génétiquement pour le RM dans les CE, nous avons croisé des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur tie2

(exprimé par les CE) avec des souris exprimant le RM floxé. L'analyse moléculaire a permis de montrer une diminution de plus de 50% de l'ARNm dans les aortes de ces souris par rapport aux souris contrôles (cf. **Article 1**).

Pour l'analyse de l'implication du RM vasculaire (CE ou CMLV), quatre groupes ont été constitués : contrôles + VH (souris n'exprimant pas la Cre recombinase et recevant uniquement le véhicule, Ctrl VH), contrôles + ciclosporine (souris n'exprimant pas la Cre recombinase et recevant la ciclosporine par voie sous-cutanée, Ctrl Ciclo), KO VH (souris exprimant la Cre recombinase et recevant uniquement le véhicule), KO Ciclosporine (souris exprimant la Cre recombinase et recevant la ciclosporine par voie sous-cutanée).

L'ensemble des expérimentations chez la souris a été approuvé par le comité d'éthique local Charles Darwin sous le numéro de saisine Ce5/2012/080.

Analyses

Analyses fonctionnelles

Sur le plan fonctionnel, nous avons suivi le poids, la pression artérielle et analysé la fonction rénale et vasculaire. Le poids a été suivi tous les jours à la même heure pour assurer une reproductibilité des mesures compte tenu des variations nyctémérales chez la souris. L'analyse de la pression artérielle a été réalisée par pléthysmographie à la queue avec l'appareil BP2000® (Bioseb, Chaville, France). L'analyse de la fonction rénale a été réalisée grâce aux dosages plasmatiques de l'urée (méthode colorimétrique) et de la créatinine (méthode enzymatique) sur un automate Konélab® v7.0.1 (Thermo Fischer Scientific Inc., France).

L'analyse de l'hémodynamique rénale a été réalisée par Sandrine Placier (Plateforme hémodynamique, Hôpital Tenon, Paris) : chez des animaux anesthésiés, l'artère fémorale gauche a été cathétérisée pour la mesure invasive de la pression artérielle, la veine fémorale droite pour les infusions de liquides et de drogues et un manchon a été positionné au niveau de l'artère rénale. La mesure de la pression artérielle a été réalisée grâce à un transducteur de

pression (Statham® P23 DB) et la mesure du débit sanguin rénal grâce à un débitmètre (0.5v probe®, Transonic systems TS420, Ithaca, NY) après des injections croissantes d'angiotensine II (Sigma Chemical, MO, USA). Les résistances vasculaires rénales sont le résultat du rapport entre la valeur de pression artérielle sanguine et le débit sanguin rénal.

Analyses histologiques

Au moment du sacrifice, les reins ont été prélevés : le rein gauche pour l'histologie et le rein droit pour la biologie moléculaire. Chaque rein prélevé a été pesé, décapsulé puis celui pour l'histologie a été coupé en deux parties égales et incluses dans deux milieux différents : l'une dans du liquide de Bouin et l'autre dans du Paraformaldéhyde 4% (PFA). Les coupes au microtome et les colorations ont été réalisées dans le laboratoire. Les analyses histologiques ont été réalisées grâce à l'aide de l'équipe du Pr Jean-Paul Duong-Van-Huyen (Service d'anatomopathologie de l'Hôpital Européen Georges Pompidou puis de l'Hôpital Necker, Paris). Après déparaffinage, les lames ont été colorées par Hémalum-Eosine (HE). L'atteinte tubulaire a été gradée selon un score semi-quantitatif de vacuolisations des cellules tubulaires contenues dans un champ à grossissement x400 sur 20 champs consécutifs de cortex rénal.

Tableau II. Score histologique de vacuolisations tubulaires.

Lésions / champs (%)	Score / champs
0	0
< 25%	1
25-50%	2
50-75%	3
>75%	4

Le score (**Tableau II**) pour chaque animal est composé par l'analyse de 20 champs successifs au niveau du cortex rénal et par la formule suivante :

$$[(4 \times \text{le nombre de champs scorés } 4) + (3 \times \text{le nombre de champs scorés } 3) + (2 \times \text{le nombre de champs scorés } 2) + (1 \times \text{le nombre de champs scorés } 1)] / 20$$

Le score minimum est 0 et le maximum est 4.

L'immunohistochimie de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), un marqueur d'agression rénale (226) a été réalisée par Claudine Perret (technicienne dans le laboratoire jusqu'en 2014) sur les coupes en paraffine à partir de reins fixés par le PFA.

Que ce soit l'analyse en microscopie optique ou en immunohistochimie, toutes ont été réalisées en aveugle par au moins deux expérimentateurs différents.

Analyses moléculaires et voies de signalisation

Au moment du sacrifice, le rein pour la biologie moléculaire a été décapsulé, pesé puis coupé en trois parties conservées par congélation à -80°C. Les ARNm ont été extraits par une technique à base de trizol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) à partir d'un tiers de rein. Les ARNm ont ensuite été rétro-transcrits grâce à la reverse transcriptase (Super Script II[®], Invitrogen, Carlsbad, USA). L'analyse a été réalisée par une méthode de Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR) sur plaques à 96 puits en duplicate dans un thermocycleur CFX96/C1000[®] (BioRad, Hercules, USA).

Les protéines ont été extraites immédiatement à partir des tissus frais (reins et demi-aortes) au moment du prélèvement (au sacrifice) grâce à un tampon à base de Sodium Dodécyl Sulfate 1% (SDS). 40µg de protéines ont été dénaturées avec un tampon 2X. Elles ont ensuite été chargées sur un gel d'agarose 4-15% (BioRad[®], Hercules, USA) pour migrer pendant 1h30. Puis elles ont été transférées en phase humide sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été saturée puis mise en incubation toute la nuit avec l'anticorps primaire anti-NGAL (R&D Systems, Minneapolis, USA), anti-peNOS (Abcam, Cambridge, UK), anti-eNOS (SantaCruz, Dallas, Texas, USA), anti-pMLCK (Life Technologies, Saint Aubin, France), anti-MLCK (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), anti-

pMLC2 (Cell Signaling, Boston, USA) ou anti-MLC2 (Cell Signaling, Boston, USA). Le lendemain, la membrane a été rincée puis incubée une heure avec l'anticorps secondaire anti-IgG (GE Healthcare Life Sciences, Germany) puis révélée après une incubation avec l'Amersham ECL Plus[®] (GE Healthcare Life Sciences, Germany).

Etude clinique

L'utilisation de l'éplérénone (antagoniste du RM) est actuellement contre-indiquée³ chez les patients présentant une insuffisance rénale avec une clairance de la créatinine inférieure à 50mL/min/1,73m². De la même façon, l'association de l'éplérénone à la ciclosporine est classiquement contre-indiquée parce qu'il n'y a pas encore eu d'étude spécifique dans cette population (cf. p. 38).

Avant de réaliser une étude clinique testant l'efficacité d'un antagoniste du RM chez les patients transplantés rénaux, il nous a fallu réaliser une étude de tolérance dans cette population afin d'en démontrer l'innocuité : l'étude EpleCsAT Safety (Eplerenone in CsA-treated Transplant recipients: Safety) a obtenu une autorisation administrative par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) sous le numéro A111066-3201 et un référencement officiel sur le site clinicaltrials.gov sous le numéro NTC01834768.

Nous avons sélectionné des patients transplantés rénaux depuis plus de 1 an n'ayant pas présenté d'épisode de rejet aigu au cours des 6 mois précédant la date d'inclusion. Nous avons choisi des patients transplantés rénaux traités par ciclosporine présentant une fonction rénale altérée (DFGe selon la formule MDRD entre 30 et 50mL/min/1,73m²) pour que les conditions de survenue d'un effet indésirable soient optimales.

L'étude de la tolérance a été adaptée à partir d'un plan de Simon en deux étapes (227). Concernant le calcul du nombre de sujets à inclure, à partir des données bibliographiques, la fréquence de l'intolérance du traitement attestée par une hyperkaliémie (> 6mmol/L) est inférieure à 7% pour une posologie de 25mg/j et inférieure à 10% pour une posologie de

4646464646464646

³ Résumé des caractéristiques produit selon l'Autorisation de Mise sur le Marché disponible sur le site <http://www.theriaque.org>

50mg/j (139-141, 219). Nous avons posé l'hypothèse alternative qu'il n'était pas utile de poursuivre l'étude si le risque d'hyperkaliémie ($> 6\text{mmol/L}$) était supérieur à 15% à la dose de 25mg/j. La puissance pour détecter un effet indésirable nécessitant l'arrêt du traitement a été fixée à 90%, le risque d'arrêter le développement de l'étude à tort était alors de 27,6%. Le nombre de sujets à inclure (sans perdu de vue) a donc été calculé *a priori* à 31 patients.

Recrutement des patients

Les patients ont été recrutés parmi les patients du centre de transplantation rénale du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Reims. En pratique, avec l'aide des Drs Lavaud et Toupance (néphrologues en charge de la transplantation rénale dans le centre), nous avons présélectionné les patients grâce au logiciel de gestion du dossier informatisé des patients Hémodialyse NX[®] (Engineering Medical Application, France). Compte tenu des critères d'inclusion (patients majeurs, sous ciclosporine, à plus d'un an de transplantation, sans rejet aigu dans les 6 mois précédant l'inclusion, DFGe entre 30 et 50mL/min/1,73m²) ainsi que des critères de non inclusion (traitements interférant avec l'éplérénone, allergie, insuffisances cardiaque ou hépatique), nous avons recruté 33 patients (**Figure 12**).

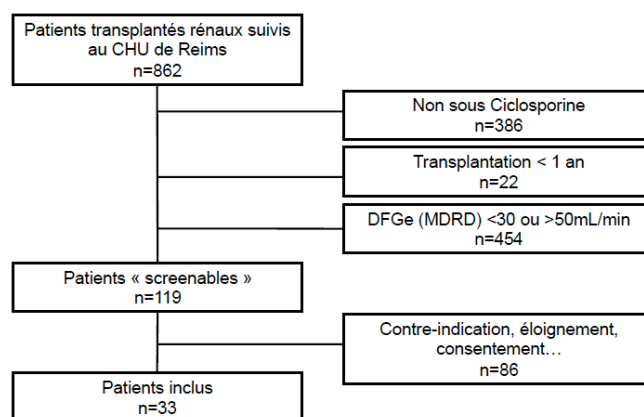


Figure 12. Diagramme de flux de l'inclusion des patients dans l'étude EpleCsAT: Safety. Parmi les patients transplantés rénaux suivis dans le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Reims, seuls ceux qui étaient traités par ciclosporine, transplantés rénaux depuis plus d'un an à la date d'inclusion et présentant un débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) entre 30 et 50 mL/min/1,73m² pouvaient être inclus. Après la vérification de l'absence de contre-indication, de la faisabilité de l'étude (notamment, compte tenu de l'éloignement par rapport au centre d'investigation) et le recueil du consentement, 33 patients ont été inclus.

Protocole expérimental

Les patients inclus au cours de l'étude ont été informés lors d'une visite de pré-inclusion. Une notice d'information leur a été remise et leur consentement éclairé a été recueilli. Le jour de l'inclusion (J0), les patients ont bénéficié d'un examen clinique, d'un électrocardiogramme (ECG) ainsi que de prélèvements biologiques sanguins et urinaires (**Tableau III**). Le traitement expérimental était fourni le jour de l'inclusion par la pharmacie de l'hôpital ainsi qu'un traitement par résine échangeuse de potassium (Kayexalate®) à utiliser en cas d'hyperkaliémie et des gélules de bicarbonate de sodium à utiliser en cas d'acidose métabolique comme le prévoyait le protocole de l'étude. Le même jour, une notice d'information (cf. **Annexe 3**) concernant le régime (développée avec l'aide d'Agnès Sotiriou, diététicienne du service de Néphrologie du CHU de Reims) leur a été remise.

La kaliémie a ensuite été suivie tous les 7 jours après un contrôle 48h après le début du traitement (J2). Au 14^{ème} jour (J14), une nouvelle consultation était prévue ainsi qu'au 28^{ème} jour de traitement (J28) et au dernier jour de traitement (J56).

Tableau III. Protocole de suivi des patients au cours de l'étude EpleCsAT: Safety.

NaU = sodium urinaire ; KU = potassium urinaire.

	Pré-inclusion	Etape 1									
		J0 ^a	J2	J7	J14 ^b	J21	J28 ^a	J35	J42	J49	J56 ^a
CONSENTEMENT ECLAIRE	X										
CLINIQUE											
Pression artérielle		X		X		X					X
Recherche d'effets indésirables		X		X		X					X
Poids		X		X		X					X
Electrocardiogramme		X				X					X
BIOLOGIQUE											
Fonction rénale estimée (eDFG par MDRD)		X		X		X					X
Kaliémie		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fraction excrétée de sodium (FeNa ⁺)		X				X					X
Ionogramme urinaire (NaU, KU), créatinurie, protéinurie		X				X					X
Albuminurie		X									X
Sérothèque		X									X
Urinothèque		X									X

Les effets indésirables étaient recueillis à tout moment de l'étude. Les patients ont été suivis par l'ensemble des médecins de l'équipe de Néphrologie du CHU de Reims.

Recueil et analyse des données

Les données ont été recueillies prospectivement à partir du dossier médical informatisé du patient dans Hémodialyse NX[®] (Engineering Medical Application, France) puis colligées dans un dossier papier de type CRF (Case Report Form) par une Assistante de Recherche Clinique. Toutes les données des patients étaient rendues anonymes par l'attribution d'un numéro spécifique d'identification. Secondairement, les données ont été saisies électroniquement dans une base de données spécifiquement conçue grâce au logiciel Microsoft[®] Office Access 2003 (Redmond, Washington, Etats-Unis).

Analyses statistiques

Les données quantitatives sont présentées par leurs moyennes \pm SEM (Standard Error of the Mean) pour la partie fondamentale et \pm SD (Standard Deviation) pour la partie clinique. Les données qualitatives sont présentées par leur effectif (avec leur pourcentage). La significativité des différences entre deux groupes a été testée par un test *t* de Student, un test de Wilcoxon, un test du χ^2 ou un test exact de Fischer lorsque nécessaire. Lorsqu'il y avait plus de deux groupes, les différences étaient analysées par une analyse de variance de type ANOVA puis par un test post-hoc de Dunn. Les analyses multivariées ont été réalisées par régression logistique de type « stepwise » à partir de tous les facteurs dont la significativité lors de l'analyse univariée était de $p \leq 0,10$. Les sensibilités et spécificités ainsi que leurs seuils ont été calculés grâce à des courbes de type Receiver Operating Characteristic (ROC).

Les analyses statistiques de la partie clinique ont été réalisées avec l'aide du Dr Coralie Barbe (Direction de la Recherche Clinique, CHU de Reims).

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé grâce au logiciel GraphPad Prism[®] 6.00 for Mac (GraphPad Software, La Jolla California, www.graphpad.com). La significativité des différences a été définie par des valeurs de $p < 0,05$, reflétant un risque *a priori* de 5%.

Résultats

Résultats préliminaires

Des signes de toxicité rénale de la ciclosporine avec vacuolisations tubulaires rénales sont observés dans notre modèle murin de néphrotoxicité de la ciclosporine (**Figure 13**).

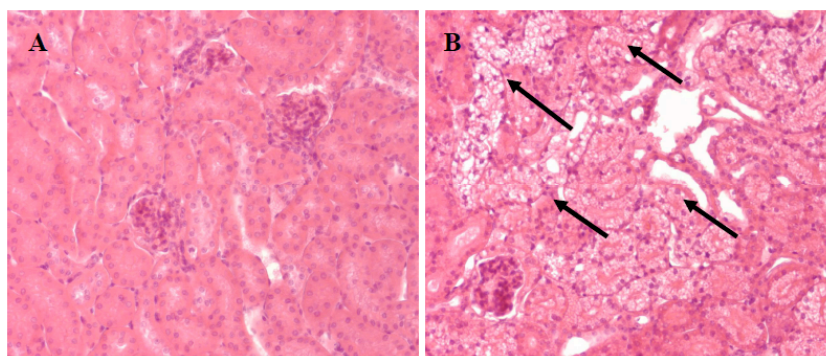


Figure 13. Lésions rénales induites par la ciclosporine au cours du modèle murin. Coloration à l'Hemalun Eosine, grossissement x400. A. Souris traitées par le véhicule. B. Souris traitées par la ciclosporine. Les flèches indiquent les lésions de vacuolisations tubulaires. Le parenchyme rénal normal de souris est composé de glomérules et de sections tubulaires et vasculaires en histologie. Lors de l'administration de ciclosporine à doses toxiques, les sections tubulaires présentent des vacuolisations (non colorées par l'éosine).

Ce modèle a ensuite été adapté chez la souris C57/Bl6 par le Dr Jenny Lançon (étudiante master 2 recherche en 2011-2012) puisque nous souhaitons l'utiliser chez des souris transgéniques (invalidées pour le gène du RM dans les vaisseaux) qui étaient sous ce fonds génétique. Ce modèle appliqué aux souris C57/Bl6 provoquait aussi des lésions rénales de néphrotoxicité de la ciclosporine (vacuolisations tubulaires) mais les lésions étaient moins importantes que ce qui avaient pu être observé dans la souche FVB/N comme en atteste le score de vacuolisations tubulaires (**Figure 14** et **Tableau II**, p. 42).

Compte tenu de la mortalité dans les groupes traités par ciclosporine et vu que nous souhaitons étudier les effets très précoces au niveau vasculaire, nous avons aussi réalisé des expérimentations après deux jours de traitement et un sacrifice au troisième jour.

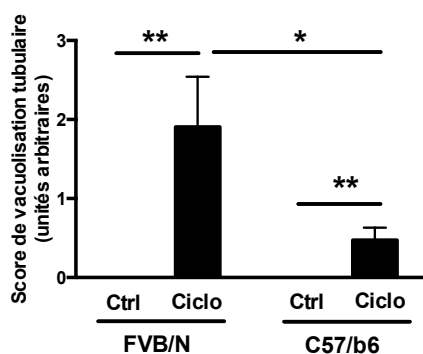


Figure 14. Score de vacuolisation tubulaire chez les souris FVB/N et C57/B16.

Ctrl = souris contrôles traitées par le véhicule ; *Ciclo* = souris traitées par ciclosporine ;

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Les souris traitées par ciclosporine présentent un score de vacuolisation tubulaire plus important que les souris contrôles. Parmi les souris traitées par ciclosporine, les souris FVB/N présentent un score de vacuolisation tubulaire plus important que les souris C57/bl6.

Article 1

Cet article expérimental soumis à la revue *Journal of the American Society of Nephrology* est actuellement en cours de révision. Il est le résultat d'un travail réalisé conjointement avec Cristian Amador (post-doctorant dans le laboratoire de 2012 à 2014) avec qui je suis co-premier auteur. Le travail a été réparti également entre nous deux : nous nous sommes partagés la gestion des lignées de souris invalidées pour le RM dans les vaisseaux ; sur le plan moléculaire, j'ai mis au point les techniques d'extraction de protéines et de western-blot et Cristian Amador les a appliquées aux échantillons ; concernant l'analyse histologique, j'ai mis au point les techniques avec le Pr Jean-Paul Duong-Van-Huyen et analysé les lames en double aveugle avec lui ; j'ai réalisé l'ensemble des analyses statistiques, rédigé la première version du manuscrit et intégré les modifications ultérieures.

Au cours de ce travail, nous montrons que les souris traitées par ciclosporine présentent des signes de toxicité globale (jugée sur l'évolution du poids) et rénale (jugée sur l'urémie, la créatininémie et les vacuolisations tubulaires). Ces signes de toxicité sont associés à une augmentation des résistances vasculaires périphériques rénales chez les souris traitées par ciclosporine. L'originalité de ce travail repose sur l'utilisation de deux modèles d'invalidation génique du RM dans les cellules vasculaires : dans les CMLV (partie que j'ai gérée principalement) et dans les CE (partie principalement gérée par Cristian Amador). Seules les souris invalidées pour le RM dans les CMLV sont protégées contre la toxicité rénale induite par la ciclosporine (jugée sur l'urémie, la créatininémie et les vacuolisations tubulaires) (Figure 2 de l'**Article 1**, p. 73). Cet effet est d'ailleurs associé à une moindre augmentation des résistances vasculaires périphériques rénales induite par l'angiotensine II sous ciclosporine chez les souris invalidées pour le RM dans les CMLV que chez les souris contrôles (non invalidées pour le RM dans les CMLV) (Figure 4 de l'**Article 1**, p. 75).

Enfin, nous avons identifié un mécanisme expliquant ce bénéfice : l'augmentation de l'activité des protéines contractiles de la CMLV par le traitement ciclosporine est totalement inhibé par l'absence d'expression du RM dans les CMLV (Figure 3 de l'**Article 1**, p. 74) : les souris traitées par ciclosporine présentent une augmentation de la phosphorylation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK), reflétant son activité (228). Par ailleurs, la quantité phosphorylée de chaîne légère de la myosine (MLC2) est elle-même plus élevée, traduisant une plus grande activité contractile (228). Ces effets sur les protéines contractiles

des CMLV sous ciclosporine sont prévenus chez les souris invalidées pour le RM dans les CMLV. Ceci serait responsable de l'augmentation des résistances intra-rénales en présence de ciclosporine et sous l'effet d'agonistes vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, un effet prévenu par l'absence de RM dans les CMLV.

Title

The vascular smooth muscle mineralocorticoid receptor mediates acute cyclosporine-induced nephrotoxicity

Running title

VSMC-MR mediates acute CIN

Authors

Jean-Philippe BERTOCCHIO^{*1,7}, Cristian AMADOR^{*1}, Sandrine PLACIER², Jean-Paul DUONG VAN HUYEN³, Soumaya EL MOGHRABI¹, Stefan BERGER⁴, David G. WARNOCK⁵, Christos CHATZIANTONIOU², Iris Z. JAFFE⁶, Philippe RIEU⁷, Frederic JAISSE¹.

* The authors contributed equally to this work

¹ INSERM UMRS 1138 – Team 1, Research Centre of Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006 Paris CEDEX, France

² Hemodynamic platform, Tenon Hospital, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France

³ Pathology Department, Necker Hospital, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

⁴ German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

⁵ University of Alabama at Birmingham, Alabama, USA

⁶ Molecular Cardiology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, Massachusetts, USA

⁷ Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, Reims University Hospital, Avenue Cognacq Jay, 51092 Reims CEDEX, France

Word count for abstract 204 words

Word count for text 1269 words

Corresponding author

Frederic JAISSE

INSERM UMRS 1138 – Team 1, Research Centre of Cordeliers, 15 rue de l'école de
médecine, 75006 Paris CEDEX, France

Tel: +33 1 44 27 81 06 / Fax: +33 1 44 27 64 21

Mail: Frederic.Jaisser@inserm.fr

Abstract

The use of calcineurin inhibitors such as cyclosporine (CsA) is often associated with calcineurin-induced nephrotoxicity (CIN). Despite this limitation, CsA is still commonly used after organ transplantation, especially in low-income countries. The mineralocorticoid receptor (MR) is now recognized as a key player in the control of vascular tone. Both endothelial and vascular smooth muscle (VSM) MR modulate the vasoactive responses to vasodilators and vasoconstrictors. Since alteration of renal hemodynamics appears central in CIN, this study tested the hypothesis that vascular MR is involved in acute CIN, and evaluated the relative contribution of the VSM vs. endothelial MR in CIN using mouse models with targeted deletion of MR in endothelial or VSM cells. Our results indicate that MR expressed in VSM, but not in endothelium, is involved in acute CIN. Inactivation of VSM MR blunted CsA-induced activation of the VSM contractile apparatus and the increase of renal vascular resistance induced by CsA was blunted when MR is deleted in VSM cells. This study provides new insights into the role of vascular MR in renal hemodynamics, and its implication in acute CIN, which strengthens the rationale for clinical studies aimed to test the potential benefit of MR antagonism in patients with or at risk for CIN.

Letter

Calcineurin inhibitors, such as Cyclosporine A (CsA) and Tacrolimus, are immunosuppressive drugs widely used in transplantation. However, calcineurin inhibitors induce nephrotoxicity that can result in kidney failure.¹ Despite this limitation, CsA is still very commonly used after organ transplantation, especially in low-income countries. Therefore, therapeutic strategies aimed at preventing or ameliorating CsA-induced nephrotoxicity (CIN) are important. The mechanisms underlying CIN remain unclear.² Alteration of renal hemodynamics appears central in CIN and renal vasoconstriction has been reported as an initial event linked to acute CIN. CsA promotes renal afferent arteriolar vasoconstriction, a pathogenic factor at least as important as tubular injury in acute CsA nephrotoxicity.³ This effect is sensitive to Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors⁴ or endothelin receptors antagonists⁵. Indeed, noradrenaline-, Angiotensin II (AngII)-, endothelin- and vasopressin-induced vasoconstriction is increased in rat arteries treated by CsA *ex vivo*.⁶⁻⁸

Pharmacological blockade of the mineralocorticoid receptor (MR) with spironolactone or eplerenone is highly effective in preventing CIN in animal models⁹⁻¹¹ and may also be useful in treating chronic kidney disease.¹² However the underlying mechanisms and cellular targets of the MR antagonists (MRA) in this setting are still unknown. The MR is now recognized to play a central role in the control of vascular tone: both endothelial and vascular smooth muscle MR modulate the vasoactive responses to vasodilators and vasoconstrictors.¹³⁻¹⁵ The aim of this study was therefore to analyze whether the vascular MR is involved in acute CIN, and if so to evaluate the relative contribution of the endothelial cell or vascular smooth muscle cell (SMC) MR in this pathology. This will add to our understanding of the mechanism of CIN and will

strengthen the rationale for clinical studies that examine the potential benefit of MRA in patients with or at risk for CIN.

To identify which vascular cell type expressing MR are involved in CIN, we administered CsA to mice with conditional inactivation of MR in either endothelial cells (Endo-MR-KO) or smooth muscle cells (SMC-MR-KO), or in control littermate (Ctl) mice. Administration of CsA for two days induced body weight loss in Ctl, Endo-MR-KO and SMC-MR-KO mice (**Figures 1A and 1B**).

Plasma urea and creatinine increased in Ctl mice (**Figures 1C-F**) and in Endo-MR-KO mice to a similar extent (**Figures 1C and 1E**). However, deletion of MR in SMC prevented this increase (Ctl+CsA vs. SMC-MR-KO+CsA: uremia 21.2 ± 5 mmol/L vs. 8.1 ± 0.8 mmol/L, creatininemia 33.7 ± 9.5 mmol/L vs. 10.4 ± 0.6 mmol/L $p < 0.05$, **Figures 1D and 1F**).

Consistent with the data showing altered renal function, Ctl mice treated with CsA showed tubular vacuolizations that have been previously described during experimental and clinical CIN¹⁶ (**Figures 2A-D**). MR deletion in SMC (**Figures 2C and 2D**) prevented histological lesions while MR deletion in endothelial cells had no effect (**Figures 2A and 2B**). In addition, the strong increase in expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), a marker of tubular injury¹⁷, in renal proximal tubules upon CsA treatment is blunted in SMC-MR-KO (**Figures S2C and S2D**) but remained unaffected in Endo-MR-KO (**Figures S2A and S2B**).

Since vasoconstriction has been established as a critical mechanism for acute CIN¹⁸, we explored whether CsA affects the level of aortic activation of the endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and of proteins of the contractile apparatus and whether this may be modulated by MR deletion in VSM. Activation of eNOS, as measured by

phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁷, is decreased after CsA treatment to a similar extent in aortas of Ctl and in SMC-MR-KO mice (**Figure 3A**). Phosphorylation of myosin light chain kinase (MLCK) at Ser¹⁷⁶⁰ and of myosin regulatory light chain 2 (MLC2) at Thr¹⁸ and Ser¹⁹ are essential for vascular contraction by stimulating the interaction of myosin with actin filaments during vascular smooth muscle contraction.¹⁸ The phosphorylation levels of MLCK as well as MLC2 proteins were increased in aortas of CsA-treated Ctl mice (**Figure 3B and 3C**, respectively) and in aortas of Endo-MR-KO mice (**Figures S3A and S3B**). However MR deletion in SMC prevented the effect of CsA on both MLCK and MLC2 phosphorylation (**Figure 3B and 3C**, respectively), thus altering a key mechanism in CsA-induced SMC contraction.

Previous clinical observations indicated that renal vascular resistance (RVR) is increased in patients shortly after oral CsA administration.¹⁹ In order to establish a direct role of SMC MR in the CsA effects on the intrarenal vasculature, we studied AngII-dose-dependent changes of blood pressure and RVR in CsA-treated mice. Baseline Mean Arterial blood Pressure (MAP) was similar in Ctl and SMC-MR-KO mice treated with CsA (mmHg: Ctl+CsA: 81 ± 3; SMC-MR-KO+CsA: 79 ± 3). The MAP is similarly increased by AngII in Ctl and SMC-MR-KO mice (**Figure 4A and 4B**). *In vivo* administration of AngII increased RVR in a dose-dependent manner in Ctl mice (**Figure 4D**). However, the increase in RVR by AngII is clearly blunted in SMC-MR-KO mice in comparison to Ctl mice (**Figure 4C and 4D**).

Taken together, these data indicate that the SMC MR, but not the Endo MR is mandatory for acute CIN. Tubular vacuolizations and overexpression of NGAL in the kidney after the treatment by CsA are blunted by specifically ablation of MR expression in SMC.

CsA administration decreases the vascular NO production, favoring vasoconstriction.²⁰ The MR deletion in SMC did not affect the CsA-induced decrease of vascular eNOS phosphorylation, a surrogate indicator of eNOS activation, suggesting that the beneficial effect of MR deletion in vascular SMC is independent of endothelial eNOS activity. In contrast, by modulating the effect of CsA on the phosphorylation of proteins that are critical for smooth muscle contraction, the vascular SMC MR acts as a key regulator of vascular contraction. The calcium-signaling pathway, which is essential for SMC contractility, is affected by both CsA and MR in vascular SMC. On one hand, CsA induces a calcium influx in vascular SMC through an inositol-phosphate pathway⁶ and calcium channels blockers are experimentally able to blunt cyclosporine-induced vascular hyperactivity²¹. On the other hand, McCurley *et al.* recently demonstrated that vascular SMC MR modulates the expression of the L-type calcium channel Cav1.2 (encoded by the *Cacna1c* gene) and that SMC MR deletion blunted the vasoconstrictive effect of a Cav1.2 agonist¹⁴. In cardiomyocytes, another contractile cell type where MR plays an essential role, MR modulates the activity of both Cav1.2 and the ryanodine receptor (RyR), affecting cardiomyocytes electrophysiology and contraction.^{22, 23} Whether RyR is also a target of MR in vascular SMC is unknown. Modulating the cellular calcium homeostasis *via* MR will affect the downstream signaling pathway, mainly the contractile machinery. Most interestingly, this will act synergistically with CsA to contribute to CIN as evidenced in the present study. Preventing MR activation by pharmacological antagonists could therefore mitigate the increased vasoconstrictive response to various vasoconstrictors known to be released locally upon calcineurin inhibition and the resulting deleterious consequences on renal hemodynamics. To date, calcium channel blockers, among the other drugs acting on the vasculature, are the only ones

to have proven their benefit during kidney transplantation in a meta-analysis on hypertension.²⁴ Our preclinical data emphasize the clinical potential of using MRA in the management of CIN. Moreover RVR could be used as a surrogate marker of MRA efficacy. The risk of MRA-related hyperkalemia should be closely monitored but evidences accumulate for the safety of MRA in patients with impaired renal function as clinically relevant hyperkalemia (leading to therapeutic intervention) are unusual, especially if close monitoring of kalemia is performed.²⁵ For example, addition of spironolactone to dual blockade of renin-angiotensin-aldosterone system drugs decreases proteinuria without life threatening hyperkalemia in transplant patients with decreased renal function.²⁶ The currently ongoing EpleCsAT: Safety trial (registration on clinicaltrial.gov: NCT#01834768) will provide important insights into the tolerability of Eplerenone in CsA-treated kidney transplant recipients.

Concise methods

Animal models. 8-weeks old C57BL/6 transgenic female mice were fed with low-salt diet (0,01%NaCl) during seven days. All groups were administered during 2 days with subcutaneous injections of vehicle (EtOH 95% and Cremophor[®] Sigma, in a relation 1:4 v/v, Control) or CsA (100mg/kg/d diluted in vehicle solution).

Genetic ablation of MR in SMC was obtained as previously described¹⁵ while deletion in the endothelium was obtained by mating transgenic mice expressing Cre recombinase in EC (Tie2-Cre mice)¹⁸ with mice harboring MR floxed alleles²⁷ resulting in Endo-MR-KO mice. Littermate Cre-negative mice were used as controls (Ctl). We confirmed efficient MR ablation since SMC-MR-KO and Endo-MR-KO mice had 2-fold decrease MR expression as compared to Ctl mice (**Figure S1A and S1B**). All animal breeding, housing, and protocols were performed in accordance with the

ethical guidelines of INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) for the care and use of laboratory animals. Our local ethical committee for animal experimentations Charles Darwin approved all experiments under the Ce5/2012/080 record. All animal experimentations adhere to the NIH Guide for Care and Use for the Laboratory Animals.

Biochemical assays. At sacrifice, blood was collected in specific tubes and centrifuged to obtain plasma, then stored at -20°C. Plasma creatinine was analyzed by an enzymatic method using a Konelab v7.0.1 automate (Thermo Fischer Scientific Inc.).

At sacrifice, abdominal aortas and kidneys were collected and proteins freshly extracted with a SDS1% buffer pH=7.4. 40µg proteins were denatured and separated by SDS-PAGE (BioRad, Hercules). After electrophoresis, proteins were blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham ECL, GE Healthcare Life Sciences, Germany), and probed with primary antibodies: anti-NGAL (Abcam, Cambridge, UK), anti-peNOS (Abcam, Cambridge, UK), anti-eNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-pMLCK (Life Technologies, Saint Aubin), anti-MLCK (Sigma-Aldrich, St Louis), anti-pMLC2, anti-MLC2 (Cell Signaling, Boston) and β-actin (Abcam, Cambridge, UK). Then, membranes were incubated with secondary antibody anti-rabbit HRP or anti-mouse HRP (GE Healthcare Life Sciences). Specific binding was detected using enhanced chemiluminescence (Amersham ECL Plus[®], GE Healthcare Life Sciences, Germany) and exposed in a Fujifilm Luminescent Image Analyzer LAS4000 System. Images of blots were quantified by densitometry analysis (ImageJ 1.43u).

Histological analysis. At sacrifice, kidneys were removed and fixed freshly in Bouin solution (Reactifs RAL, Martillac, France) or Paraformaldehyde 4% solutions over night before being included into paraffin blocks. 4µm sections were performed for

Haematoxylin-Eosin staining (Bouin fixation) and for Immunohistochemistry of NGAL. Tubular vacuolizations were scored with a semi-quantitative score by two pathologists blinded to the experimental groups. Kidney sections were incubated with anti-NGAL antibody (R&D Systems, Minneapolis) before anti-IgG secondary antibody for DAB peroxidase-revelation.

Renal Hemodynamics. After the 2 days of subcutaneous CsA treatment, the animals were anesthetized by pentobarbital sodium (50-60mg/kg body weight i.p., Nembutal[®], Abbott, Chicago, IL) and moved to a servo-controlled table kept at 37°C. The left femoral artery was catheterized for measurement of arterial pressure, and a femoral venous catheter was used for infusion of volume replacement. Bovine serum albumin (4.75g/dL of saline solution) was infused initially at 50μL/min to replace surgical losses, and then at 10μL/min for maintenance. Arterial pressure was measured *via* a pressure transducer (Statham P23 DB); RBF was measured by a flowmeter (0.5v probe, Transonic systems TS420, Ithaca, NY). RBF values were controlled for zero offset determined at the end of an experiment after cardiac arrest. Data were recorded, stored and analyzed using DataTranslation analog-to-digital converter and the IOX software (EMKA Technologies, Paris France). RBF was measured during intravenous bolus injections of AngII (0.5, 1 and 2 ng) (Sigma Chemical, MO, USA). Finally, RVR was obtained from the relation between blood pressure and RBF.

Statistical methods. All data are summarized by mean ± SEM. Data were analyzed by 2-way ANOVA followed by Dunn *post hoc* test or by lineal regression and comparison between slopes for renal hemodynamics. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant. Graphpad Prism[®] 6.00 for Mac (GraphPad

Software, La Jolla California, www.graphpad.com) was used in all statistical analyses.

Financial & institutional supports

This work was supported by “Institut National pour la Santé et Recherche Médicale”, and grants from the “Agence Nationale pour la Recherche” [ANR09-BLAN-0156-01], the “Centre de Recherche Industrielle et Technique” and the FP7-funded COST-ADMIRE BM1301 network. CA was supported by “CONICYT, Beca de Postdoctorado en el Extranjero, Becas-Chile” N°74130051.

Competing financial interests

None

References

1. Nankivell, BJ, Borrows, RJ, Fung, CL, O'Connell, PJ, Allen, RD, Chapman, JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*, 349: 2326-2333, 2003.
2. Naesens, M, Kuypers, DR, Sarwal, M: Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4: 481-508, 2009.
3. English, J, Evan, A, Houghton, DC, Bennett, WM: Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation*, 44: 135-141, 1987.
4. Barros, EJ, Boim, MA, Alzen, H, Ramos, OL, Schor, N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*, 32: 19-25, 1987.
5. Binet, I, Wallnöfer, A, Weber, C, Jones, R, Thiel, G: Renal hemodynamics and pharmacokinetics of bosentan with and without cyclosporine A. *Kidney Int*, 57: 224-231, 2000.

6. Lo Russo, A, Passaquin, AC, Andre, P, Skutella, M, Ruegg, UT: Effect of cyclosporin A and analogues on cytosolic calcium and vasoconstriction: possible lack of relationship to immunosuppressive activity. *Br J Pharmacol*, 118: 885-892, 1996.
7. Auch-Schwelk, W, Duske, E, Hink, U, Betz, M, Unkelbach, M, Fleck, E: Vasomotor responses in cyclosporin A-treated rats after chronic angiotensin blockade. *Hypertension*, 23: 832-837, 1994.
8. Rouillet, JB, Xue, H, McCarron, DA, Holcomb, S, Bennett, WM: Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest*, 93: 2244-2250, 1994.
9. Perez-Rojas, JM, Derive, S, Blanco, JA, Cruz, C, Martinez de la Maza, L, Gamba, G, Bobadilla, NA: Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289: F1020-1030, 2005.
10. Bobadilla, NA, Gamba, G: New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293: F2-9, 2007.
11. Nielsen, FT, Jensen, BL, Marcussen, N, Skott, O, Bie, P: Inhibition of mineralocorticoid receptors with eplerenone alleviates short-term cyclosporin A nephrotoxicity in conscious rats. *Nephrol Dial Transplant*, 23: 2777-2783, 2008.
12. Bertocchio, JP, Warnock, DG, Jaisser, F: Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 79: 1051-1060, 2011.
13. Nguyen Dinh Cat, A, Griol-Charhbili, V, Loufrani, L, Labat, C, Benjamin, L, Farman, N, Lacolley, P, Henrion, D, Jaisser, F: The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J*, 24: 2454-2463, 2010.

14. McCurley, A, Pires, PW, Bender, SB, Aronovitz, M, Zhao, MJ, Metzger, D, Chambon, P, Hill, MA, Dorrance, AM, Mendelsohn, ME, Jaffe, IZ: Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nature medicine*, 18: 1429-1433, 2012.
15. Galmiche, G, Pizard, A, Gueret, A, El Moghrabi, S, Ouvrard-Pascaud, A, Berger, S, Challande, P, Jaffe, IZ, Labat, C, Lacolley, P, Jaisser, F: Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension*, 63: 520-526, 2014.
16. Liptak, P, Ivanyi, B: Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2: 398-404, 2006.
17. Viau, A, El Karoui, K, Laouari, D, Burtin, M, Nguyen, C, Mori, K, Pillebout, E, Berger, T, Mak, TW, Knebelmann, B, Friedlander, G, Barasch, J, Terzi, F: Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *The Journal of clinical investigation*, 120: 4065-4076, 2010.
18. Butler, T, Paul, J, Europe-Finner, N, Smith, R, Chan, EC: Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *American journal of physiology Cell physiology*, 304: C485-504, 2013.
19. Kaye, D, Thompson, J, Jennings, G, Esler, M: Cyclosporine therapy after cardiac transplantation causes hypertension and renal vasoconstriction without sympathetic activation. *Circulation*, 88: 1101-1109, 1993.
20. Diederich, D, Skopec, J, Diederich, A, Dai, FX: Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension*, 23: 957-961, 1994.
21. Rego, A, Vargas, R, Suarez, KR, Foegh, ML, Ramwell, PW: Mechanism of cyclosporin potentiation of vasoconstriction of the isolated rat mesenteric arterial bed:

role of extracellular calcium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 254: 799-808, 1990.

22. Gomez, AM, Rueda, A, Sainte-Marie, Y, Pereira, L, Zissimopoulos, S, Zhu, X, Schaub, R, Perrier, E, Perrier, R, Latouche, C, Richard, S, Picot, MC, Jaisser, F, Lai, FA, Valdivia, HH, Benitah, JP: Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins. *Circulation*, 119: 2179-2187, 2009.

23. Ouvrard-Pascaud, A, Sainte-Marie, Y, Benitah, JP, Perrier, R, Soukaseum, C, Nguyen Dinh Cat, A, Royer, A, Le Quang, K, Charpentier, F, Demolombe, S, Mechta-Grigoriou, F, Beggah, AT, Maison-Blanche, P, Oblin, ME, Delcayre, C, Fishman, GI, Farman, N, Escoubet, B, Jaisser, F: Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation*, 111: 3025-3033, 2005.

24. Cross, NB, Webster, AC, Masson, P, O'Connell P, J, Craig, JC: Antihypertensives for kidney transplant recipients: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Transplantation*, 88: 7-18, 2009.

25. Rossignol, P, Dobre, D, McMurray, JJ, Swedberg, K, Krum, H, van Veldhuisen, DJ, Shi, H, Messig, M, Vincent, J, Girerd, N, Bakris, G, Pitt, B, Zannad, F: Incidence, determinants, and prognostic significance of hyperkalemia and worsening renal function in patients with heart failure receiving the mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone or placebo in addition to optimal medical therapy: results from the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Circulation Heart failure*, 7: 51-58, 2014.

26. Gonzalez Monte, E, Andres, A, Polanco, N, Toribio, MJ, Santana, R, Gutierrez Martinez, E, Gonzalez, J, Ramirez, E, Hernandez, A, Morales, E, Praga, M, Morales,

JM: Addition of spironolactone to dual blockade of renin angiotensin system dramatically reduces severe proteinuria in renal transplant patients: an uncontrolled pilot study at 6 months. *Transplant Proc*, 42: 2899-2901, 2010.

27. Berger, S, Wolfer, DP, Selbach, O, Alter, H, Erdmann, G, Reichardt, HM, Chepkova, AN, Welzl, H, Haas, HL, Lipp, HP, Schutz, G: Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 195-200, 2006.

Figures legends

Figure 1. MR KO in SMC but not in Endothelium prevents cyclosporine-induced kidney failure

SMC: Smooth Muscle Cells; Endo: Endothelium; MR: Mineralocorticoid Receptor; Ctl: Control; KO: Knockout; VH: vehicle; CsA: Cyclosporine. Body weight loss induced by cyclosporine is similar in Endo-MR-KO mice (**A**) and in SMC-MR-KO mice (**B**). Cyclosporine-induced increase in plasma urea is not prevented in Endo-MR-KO mice (**C**), but is prevented in SMC-MR-KO mice (**D**). Cyclosporine-induced creatinine increase is not prevented in Endo-MR-KO mice (**E**), but is prevented in SMC-MR-KO mice (**F**). Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 12 in each group). * $p<0.05$ CsA vs. VH; ** $p<0.01$ CsA vs. VH; *** $p<0.001$ CsA vs. VH.

Figure 2. MR KO in SMC but not in Endothelium prevents cyclosporine-induced tubular vacuolization

Tubular vacuolization is induced by Cyclosporine in kidneys of Endo-MR-KO mice (**A**) but not in SMC-MR-KO mice (**C**). The scoring of tubular vacuolization for Endo-MR-KO (**B**) and SMC-MR-KO mice (**D**) shows that the ablation of MR in SMC blunted the CsA-dependent vacuolization. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5 to 12 in each group). * $p<0.05$ CsA vs. VH; ** $p<0.01$ CsA vs. VH; *** $p<0.001$ CsA vs. VH. Bar=50 μ m.

Figure 3. MR KO in SMC prevents cyclosporine-induced phosphorylation of contractile proteins

eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase; MLCK: myosin light chain kinase; pMLCK: phosphorylated form of MLCK; MLC2: myosin regulatory light chain 2; pMLC2:

phosphorylated form of MLC2. The decrease of eNOS phosphorylation by Cyclosporine is similar in Ctl and SMC-MR-KO mice (**A**). The increase in MLCK (**B**) and MLC2 (**C**) phosphorylation by Cyclosporine is prevented by the ablation of MR in SMC. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 9 in each group). * p <0.05 for the indicated group comparisons.

Figure 4. MR KO in SMC prevents the dose-dependent increase in renal vascular resistance induced by in vivo AngII infusion

MAP: Mean Arterial Pressure; RVR: Renal Vascular Resistance. Maximum variation in MAP (**A-B**) and RVR (**C-D**) produced by *in vivo* administration of AngII in Ctl and SMC-MR-KO mice treated with CsA. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 9 in each group). * p <0.05 vs. control between slopes after linear regression.

Figure S1. mRNA abundance of MR in aortas from Endo-MR-KO and SMC-MR-KO mice

The mRNA abundance of MR is decreased in aortas from Endo-MR-KO (**A**) and SMC-MR-KO (**B**) mice under low salt diet conditions. Data are expressed as mean \pm SEM (n=4 to 5 in each group). * p <0.05 CsA vs. VH.

Figure S2. MR KO in SMC and not in Endo prevents the cyclosporine-induced renal expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

Renal NGAL expression is induced by Cyclosporine in Endo-MR-KO mice (**A**) but not prevented in SMC-MR-KO mice (**C**). Bar=50 μ m. Relative abundance of renal NGAL protein is increased by cyclosporine in Endo-MR-KO (**B**) but not in SMC-MR-KO

mice (**D**). Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 9 in each group). ** $p<0.01$ CsA vs. VH; *** $p<0.001$ CsA vs. VH.

Figure S3. MR KO in the endothelium does not prevent cyclosporine-induced activation of contractile proteins

Cyclosporine-induced phosphorylation of MLCK (**A**) or MLC2 (**B**) is not prevented in aortas of Endo-MR-KO mice. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5 to 6 in each group). * $p<0.05$ vs. VH; ** $p<0.01$ vs. VH.

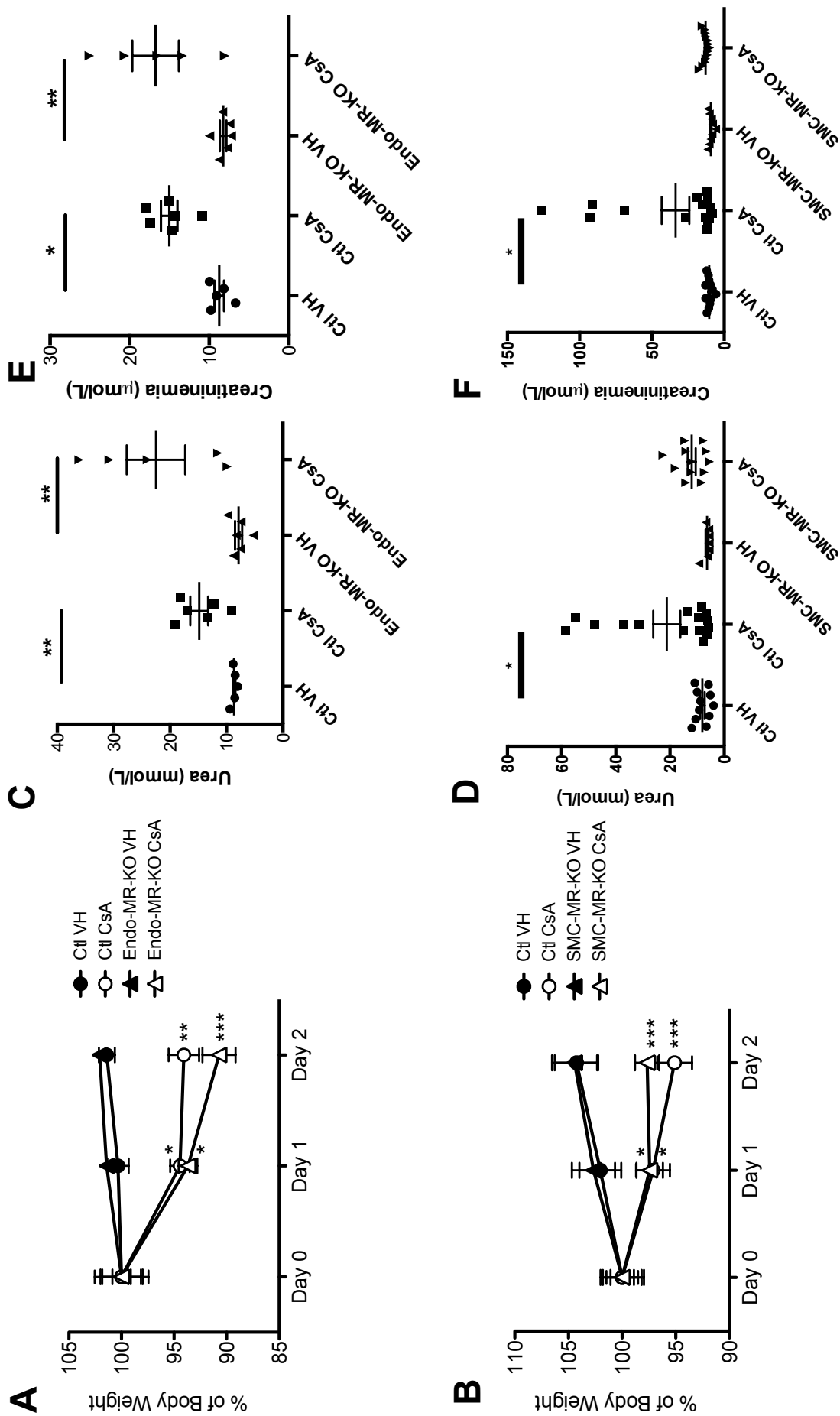


Figure 1. MR KO in SMC but not in Endothelium prevents cyclosporine-induced kidney failure SMC: Smooth Muscle Cells; Endo: Endothelium; MR: Mineralocorticoid Receptor; Ctl: Control; KO: Knockout; VH: vehicle; CsA: Cyclosporine. Body weight loss induced by cyclosporine is similar in Endo-MR-KO mice (A) and in SMC-MR-KO mice (B). Cyclosporine-induced increase in plasma urea is not prevented in Endo-MR-KO mice (C), but is prevented in SMC-MR-KO mice (D). Cyclosporine-induced creatinine increase is not prevented in Endo-MR-KO mice (E), but is prevented in SMC-MR-KO mice (F). Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 12 in each group). * $p<0.05$ CsA vs. VH; ** $p<0.01$ CsA vs. VH; *** $p<0.001$ CsA vs. VH.

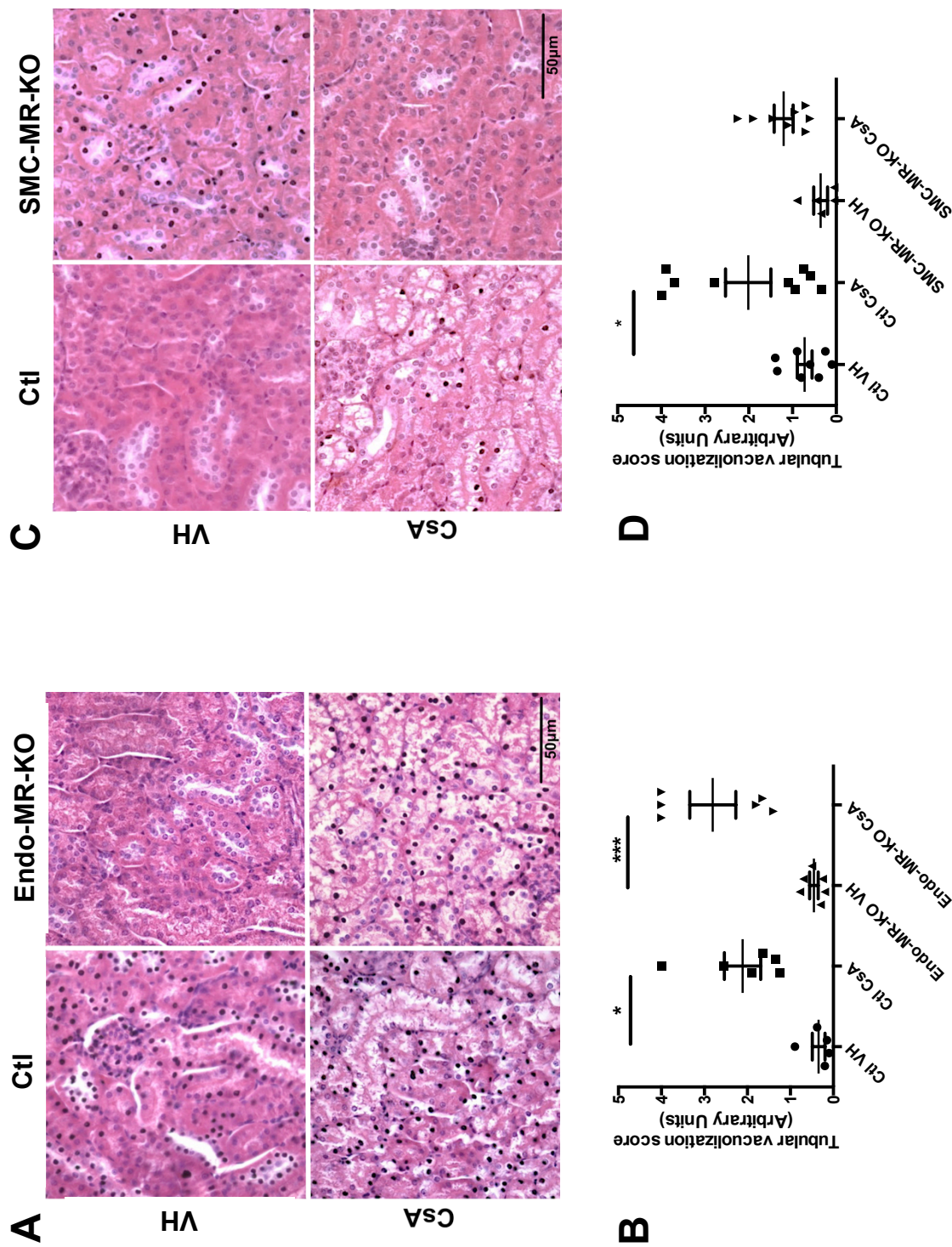
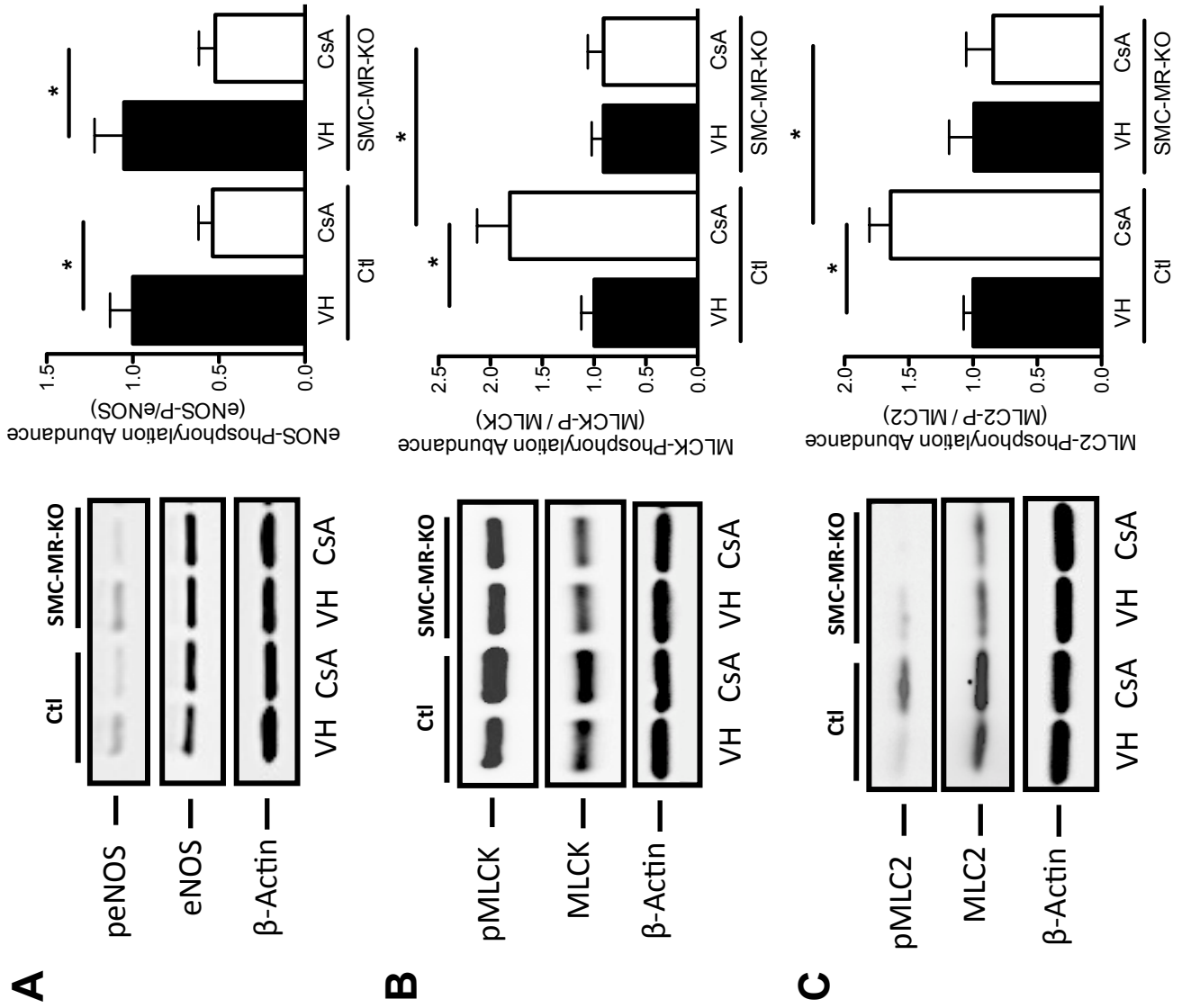


Figure 2. MR KO in SMC but not Endothelium prevents cyclosporine-induced tubular vacuolization Tubular vacuolization is induced by Cyclosporine in kidneys of Endo-MR-KO mice (A) but not in SMC-MR-KO mice (C). The scoring of tubular vacuolization for Endo-MR-KO mice (B) and SMC-MR-KO mice (D) shows that the ablation of MR in SMC blunted the CsA-dependent vacuolization. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5 to 12 in each group). * p <0.05 CsA vs. VH; ** p <0.01 CsA vs. VH; *** p <0.001 CsA vs. VH. Bar=50µm.

Figure 3. MR KO in SMC prevents cyclosporine-induced phosphorylation of contractile proteins eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase; MLCK: myosin light chain kinase; pMLCK: phosphorylated form of MLCK; MLC2: myosin regulatory light chain 2; pMLC2: phosphorylated form of MLC2. The decrease of eNOS phosphorylation by Cyclosporine is similar in Ctl and SMC-MR-KO mice (**A**). The increase in MLCK (**B**) and MLC2 (**C**) phosphorylation by Cyclosporine is prevented by the ablation of MR in SMC. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 9 in each group). * $p < 0.05$ for the indicated group comparisons.



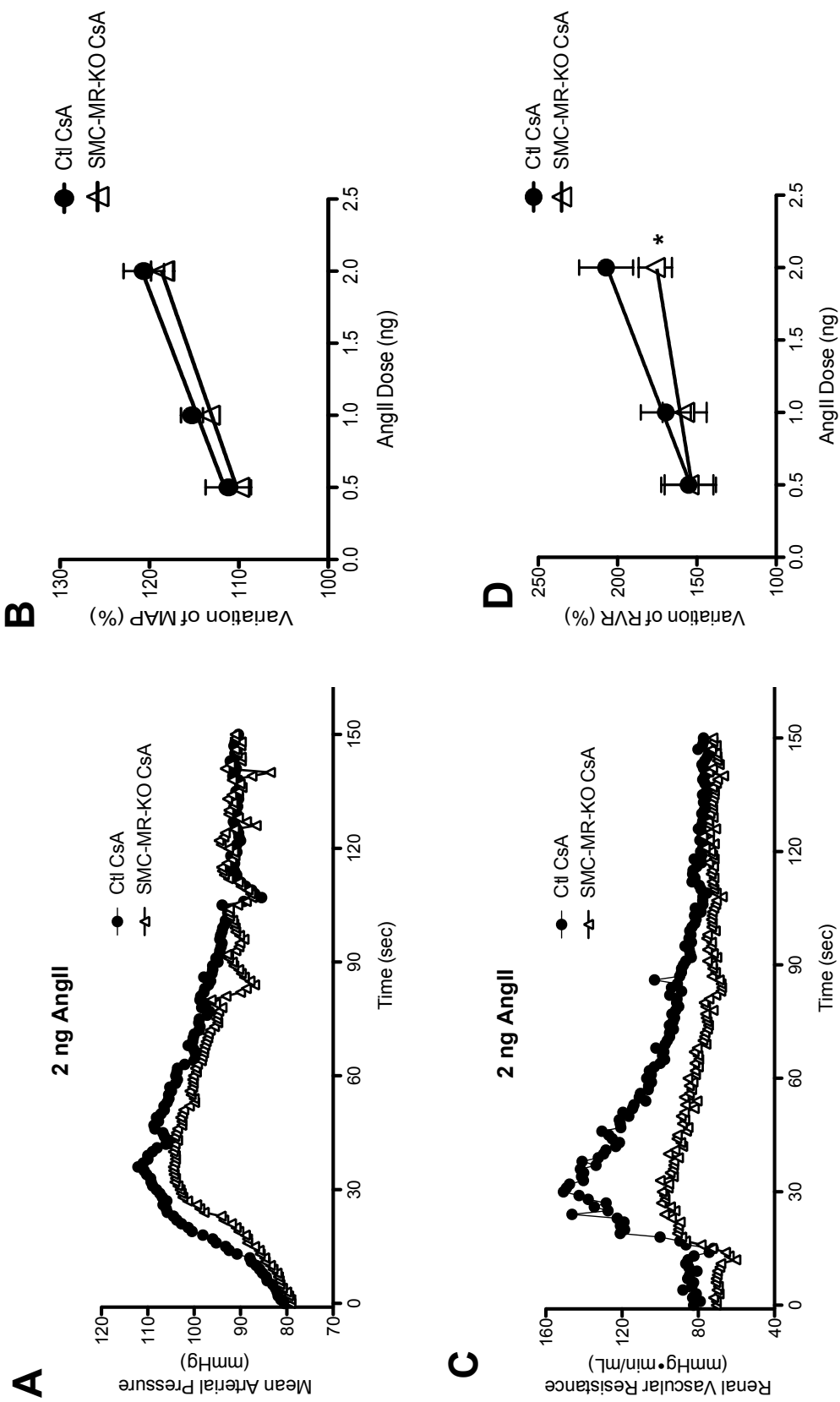


Figure 4. MR KO in SMC prevents the dose-dependent increase in renal vascular resistance induced by in vivo AngII infusion MAP: Mean Arterial Pressure; RVR: Renal Vascular Resistance. Maximum variation in MAP (A-B) and RVR (C-D) produced by *in vivo* administration of AngII in Ctl and SMC-MR-KO mice treated with CsA. Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 9 in each group). * p <0.05 vs. control between slopes after linear regression.

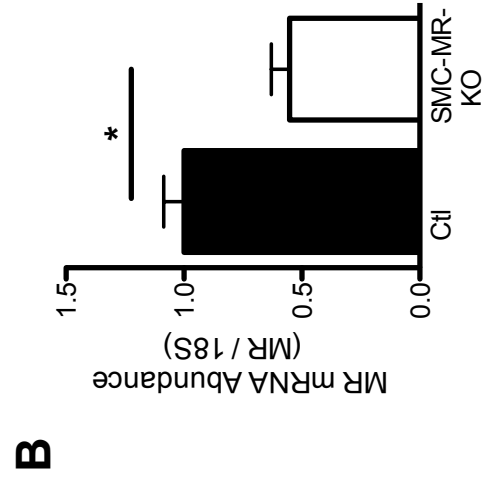
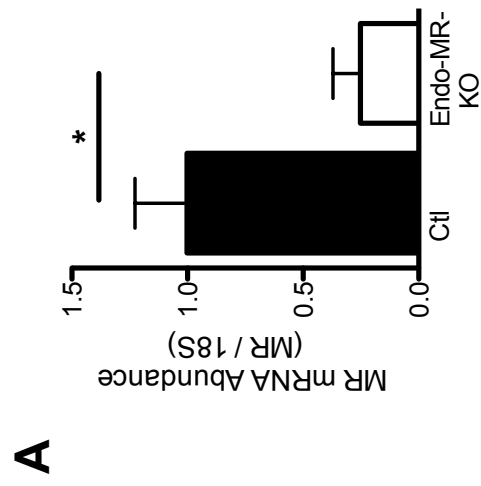


Figure S1. mRNA abundance of MR in aortas from Endo-MR-KO and SMC-MR-KO mice The mRNA abundance of MR is decreased in aortas from Endo-MR-KO (A) and SMC-MR-KO (B) mice under low salt diet conditions. Data are expressed as mean \pm SEM (n=4 to 5 in each group). * p <0.05 CsA vs. VH.

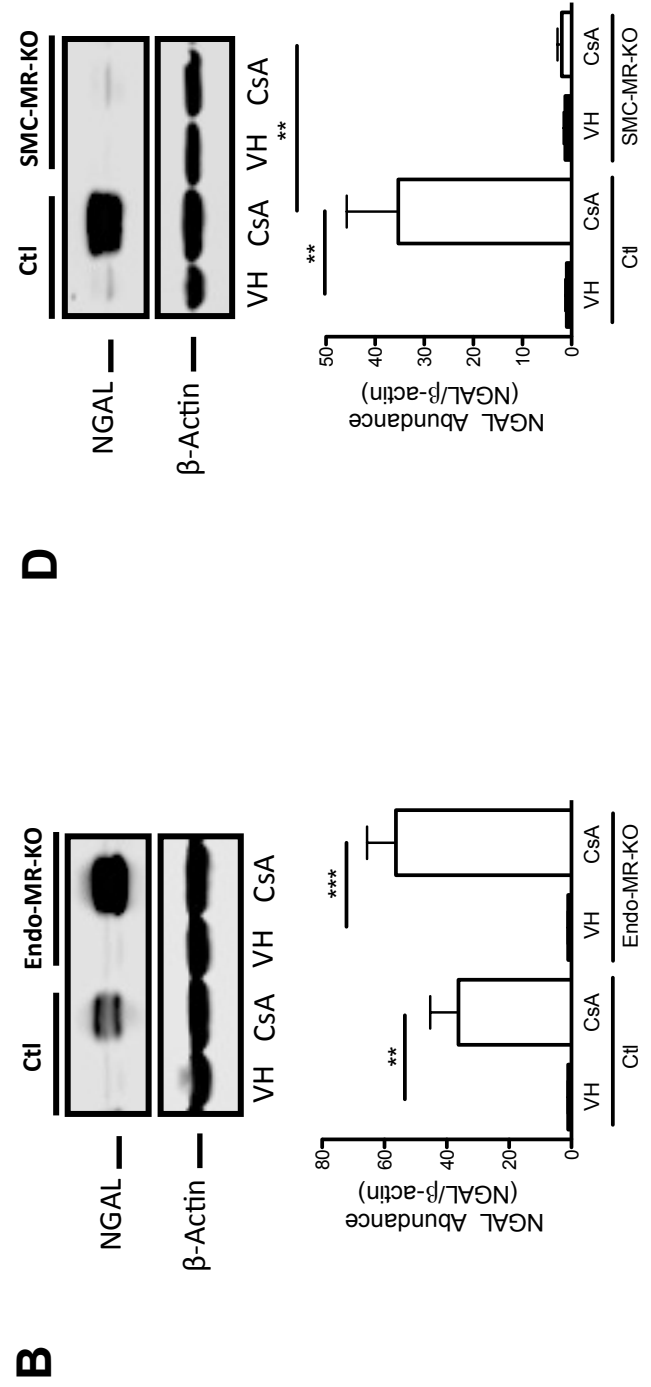
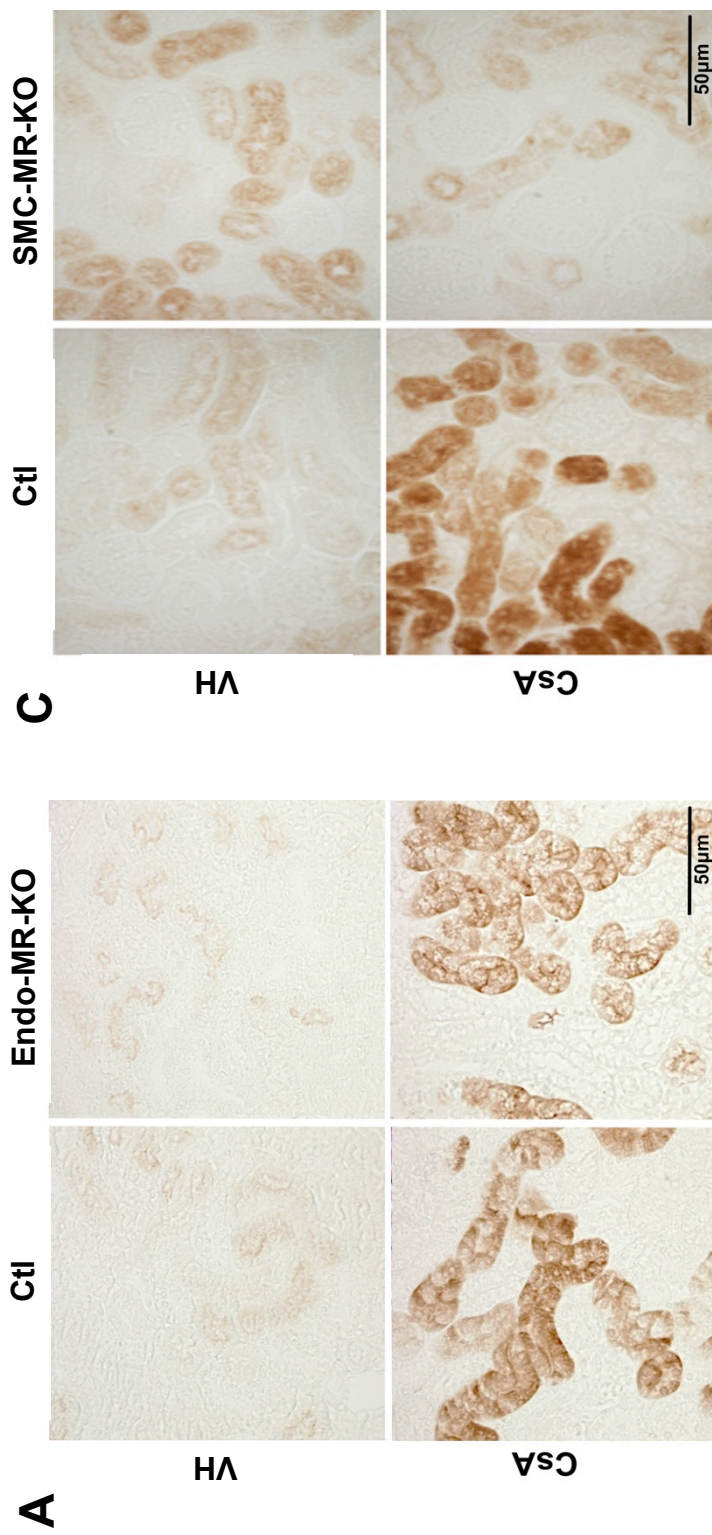


Figure S2. MR KO in SMC and not in Endo prevents the cyclosporine-induced renal expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) Renal NGAL expression is induced by Cyclosporine in Endo-MR-KO mice (A) but not prevented in SMC-MR-KO mice (C). Bar=50 μ m. Relative abundance of renal NGAL protein is increased by cyclosporine in Endo-MR-KO (B) but not in SMC-MR-KO mice (D). Data are expressed as mean \pm SEM (n=6 to 9 in each group). ** $p < 0.01$ CsA vs. VH; *** $p < 0.001$ CsA vs. VH.

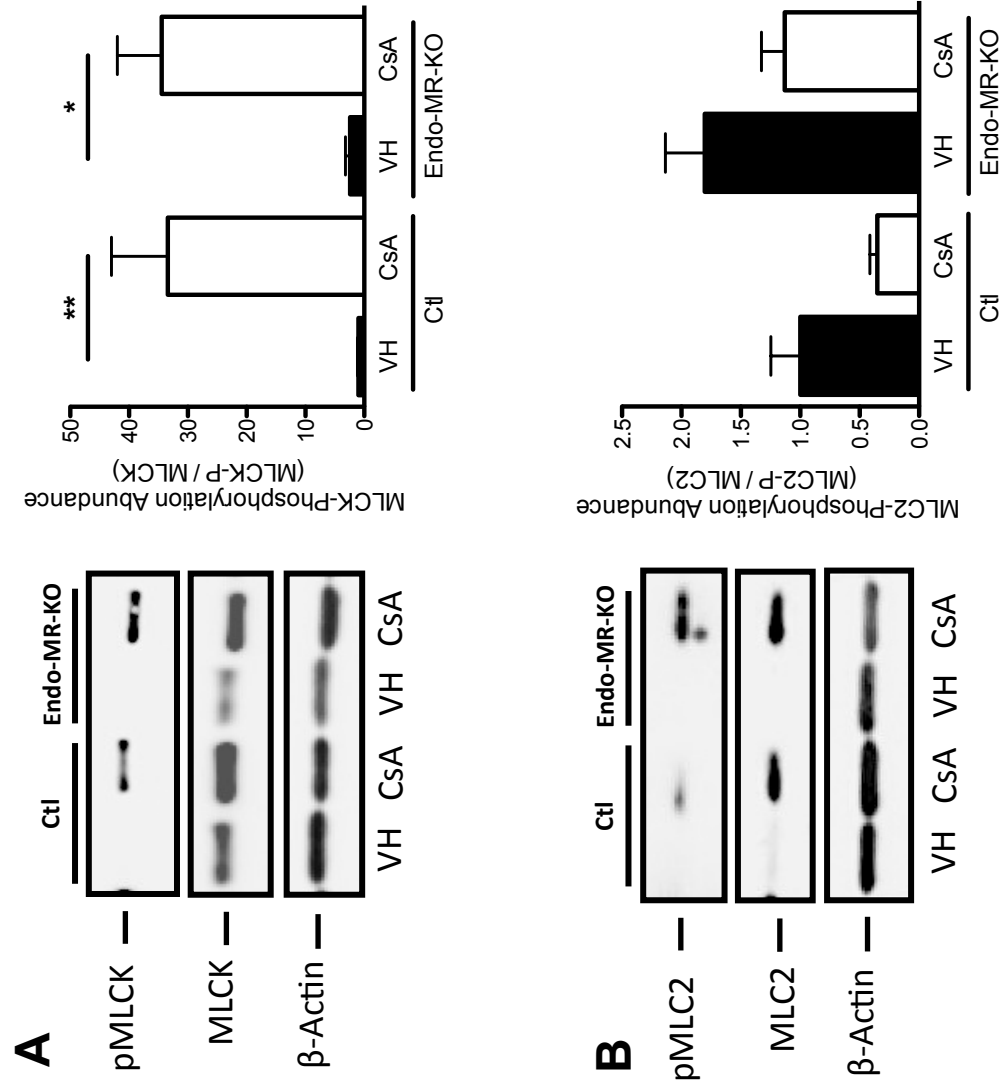


Figure S3. MR KO in the endothelium does not prevent cyclosporine-induced activation of contractile proteins Cyclosporine-induced phosphorylation of MLCK (A) or MLC2 (B) is not prevented in aortas of Endo-MR-KO mice. Data are expressed as mean \pm SEM (n=5 to 6 in each group). * p <0.05 vs. VH; ** p <0.01 vs. VH.

Discussion

L'ensemble de ces résultats apporte des données originales sur les mécanismes vasculaires de la néphrotoxicité aiguë de la ciclosporine. Ce modèle présente tout de même des limitations. Les doses de ciclosporine utilisées dans ces modèles précliniques sont très élevées (100mg/kg/j) et ne reflètent pas forcément l'utilisation clinique actuelle (environ 4mg/kg/j) mais la souris sur fonds génétique C57/Bl6 est un animal particulièrement résistant aux agressions rénales. Le modèle nécessite un régime pauvre en sel, soulignant l'implication du SRAA. Il faut noter que les patients traités par ciclosporine sont eux aussi régulièrement sous régime pauvre en sel afin de limiter l'hypertension artérielle systémique.

Par ailleurs, les atteintes tubulaires observées au cours de notre modèle semblent concomitantes des effets vasculaires. Etant donné que le RM n'est pas exprimé dans le tubule proximal, les conséquences de l'invalidation génique du RM uniquement dans les CMLV sur le tubule proximal suggèrent que l'on observe un retentissement tubulaire des effets bénéfiques vasculaires de l'invalidation du RM : ceci n'empêche pas les effets directs de la ciclosporine dans le tubule proximal mais pourrait les atténuer. L'hypothèse qui nous semble la plus probable est celle d'une ischémie tubulaire qui aurait un effet synergique avec les effets directs de la ciclosporine sur l'épithélium tubulaire : l'augmentation de la vasoconstriction induite par la ciclosporine induirait une souffrance tubulaire hypoxique conduisant à des lésions de vacuolisations tubulaires prévenues lorsque l'on limite cette vasoconstriction. Cette hypothèse concernant les effets bénéfiques de l'invalidation génique du RM vasculaire sur l'hypoxie tissulaire relative reste à confirmer au cours d'études ultérieures.

Enfin, une des questions importantes est celle du mécanisme reliant les effets du RM à ceux de la ciclosporine dans les CMLV. Une de nos hypothèses est celle impliquant le métabolisme cellulaire du calcium au sein de la CMLV. En effet, la ciclosporine agit sur la vasoconstriction, au moins en partie, par une augmentation de la concentration cytosolique de calcium *via* une augmentation de l'entrée de calcium depuis le compartiment extracellulaire (en augmentant l'activité du canal membranaire calcique voltage-dépendant de type L (115, 116)) et *via* une augmentation de la libération cytosolique de calcium depuis les réserves intracellulaires (cf. p. 25). Le RM a lui aussi une action sur la signalisation calcique au sein de la CMLV : il module l'expression et l'activité de la sous-unité α du canal calcique voltage-dépendant de type L (Cav1.2) qui agit sur le tonus vasculaire (15). Il est possible que

l'activation du RM permette une sensibilisation à l'action de la ciclosporine par l'augmentation de l'expression et de l'activité de sous-unités de canaux telles que Cav1.2 : une fois en présence de ciclosporine, les CMLV « pré-activées » par le RM pourraient présenter une augmentation plus importante de calcium intracellulaire et donc être plus sensibles à la vasoconstriction (**Figure 15**). Depuis mon départ du laboratoire, Cristian Amador et Gwennan André, post-doctorants dans le laboratoire, ont montré sur un modèle de rein de souris isolé perfusé que le RM exprimé dans les CMLV modulait l'activité du canal calcique voltage-dépendant de type L, affectant la contraction du muscle lisse vasculaire : l'invalidation du RM dans les CMLV limite ainsi l'activation délétère du canal calcique par la ciclosporine et réduit la vasoconstriction de la vascularisation rénale induite par la ciclosporine.

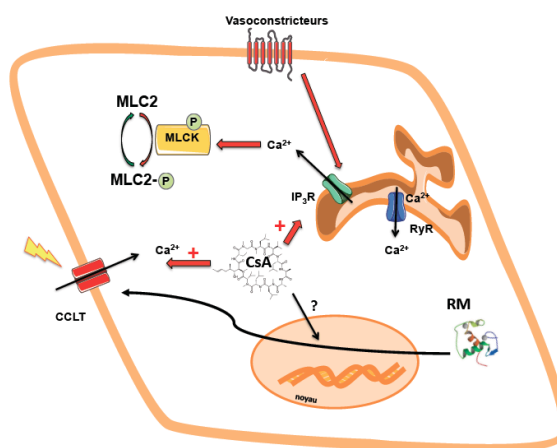


Figure 15. Mécanisme proposé d'interaction entre la ciclosporine et le Récepteur Minéralocorticoïde dans les cellules musculaires lisses vasculaires : la signalisation calcique. *MLC2 = chaîne légère de la myosine ; MLCK = kinase de la chaîne légère de la myosine ; CCLT = canal calcique voltage-dépendant de type L ; Ca²⁺ = calcium ; CsA = ciclosporine ; RM = Récepteur Minéralocorticoïde ; IP₃R = Récepteur de l'inositol triphosphate ; RyR = Récepteur de la ryanodine. Lorsqu'un agent vasoconstricteur se lie à son récepteur à 7 domaines transmembranaires à la surface de la cellule musculaire lisse vasculaire, il induit une libération de calcium (Ca²⁺) depuis les réserves intracellulaires par le récepteur de l'inositol triphosphate (IP₃R). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induit la phosphorylation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) qui active à son tour la chaîne légère de la myosine (MLC2) en la phosphorylant et induit ainsi la contraction de la cellule. Le Récepteur Minéralocorticoïde (RM) et la ciclosporine (CsA) augmentent l'activité et/ou l'expression membranaire du canal calcique voltage-dépendant de type L (CCLT) qui induit une augmentation du flux calcique entrant dans la cellule. Enfin, la ciclosporine augmente l'activité du récepteur à l'inositol triphosphate.*

Une autre voie pourrait expliquer les mécanismes d'interaction entre le RM et la ciclosporine dans la vasomotricité des CMLV : celle de la CaN (phosphatase 2B). La ciclosporine, par son activité inhibitrice sur la CaN, module l'activité des canaux potassiques induite par la concentration cytosolique de calcium et donc la vasoconstriction au sein des CMLV (229). Une partie de l'activité transcriptionnelle du RM est médiée par la sous-unité A β de la CaN (230). Par ailleurs, de plus en plus de données émergent sur les modifications post-traductionnelles du RM, notamment sa phosphorylation, et leurs effets sur l'activité de ce récepteur (231). Il est donc possible que le RM exerce au moins une partie de ses effets vasculaires sous une forme phosphorylée et que la CaN – par son activité phosphatase – inhibe une partie de cette activité. En présence de ciclosporine, l'inhibition serait levée conduisant à la vasoconstriction (**Figure 16**).

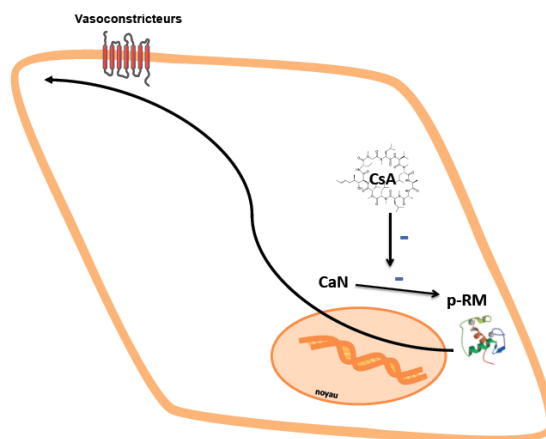


Figure 16. Mécanisme proposé d'interaction entre la ciclosporine et le Récepteur Minéralocorticoïde dans les cellules musculaires lisses vasculaires : la calcineurine.

CsA = ciclosporine ; CaN = calcineurine ; p-RM = forme phosphorylée du Récepteur Minéralocorticoïde. Le Récepteur Minéralocorticoïde exercerait une partie de ses effets (notamment ceux favorisant la vasoconstriction) sous une forme phosphorylée (p-RM). La calcineurine (CaN) en déphosphorylant la forme phosphorylée du Récepteur Minéralocorticoïde inhiberait une partie de son activité. La ciclosporine (CsA) en inhibant l'activité de la calcineurine augmenterait alors l'activité de la forme phosphorylée du Récepteur Minéralocorticoïde.

Enfin, les effets que nous observons sont applicables uniquement à la ciclosporine. Or, en transplantation, si l'inhibition de la CaN paraît centrale au cours du traitement immunosuppresseur, le tacrolimus (l'autre molécule à activité anticalcineurine utilisée en transplantation) est une drogue de plus en plus utilisée (cf. Introduction, p. 8). Si la ciclosporine et le tacrolimus partagent la plupart de leurs effets indésirables, il n'est pas

certain qu'ils aient les mêmes mécanismes d'action : une étude spécifique sur l'action de cette autre anticalcineurine est donc nécessaire (cf. **Article 2**).

Au total, l'ensemble de ces données explique en partie pourquoi les inhibiteurs calciques sont à l'heure actuelle les seuls traitements antihypertenseurs ayant démontré un intérêt dans la néphroprotection chez les patients transplantés rénaux (209). En revanche, si aucun des autres traitements agissant sur le SRAA n'a démontré son intérêt, compte tenu des mécanismes physiopathologiques décrits ci-dessus, il paraît possible de proposer désormais l'utilisation d'un des antagonistes pharmacologiques du RM qui n'ont jamais été testés, eux, dans cette population (cf. **Article 3**).

Article 2

La rédaction de cet article est actuellement en cours. Il est le résultat d'un travail réalisé conjointement avec le Dr Aldjia Hocine (étudiante en master 2 recherche dans le laboratoire de 2011 à 2012), le Dr Jenny Lançon (étudiante en master 2 recherche dans le laboratoire de 2010 à 2011) et Cristian Amador (post-doctorant dans le laboratoire de 2012 à 2014).

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux effets rénaux de l'antagonisme pharmacologique du RM au cours de la néphrotoxicité des deux anticalcineurines utilisées en transplantation (ciclosporine et tacrolimus). Lors de mon master 2 recherche dans le laboratoire (de 2009 à 2010), j'avais démontré que l'utilisation pendant 10 jours du canrénoate (un antagoniste pharmacologique du RM) permettait de limiter les toxicités rénale (jugée sur la fonction rénale, le score de vacuolisation tubulaire – cf. p. 44 – et l'excrétion urinaire de NGAL, **Figure 17**) et globale jugée sur la survie.

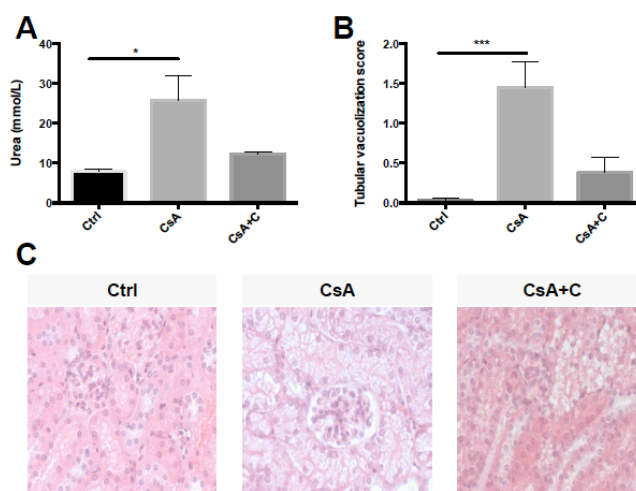


Figure 17. Antagonisme pharmacologique du Récepteur Minéralocorticoïde au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine.

Ctrl = souris contrôles ; *CsA* = souris traitées par ciclosporine sous-cutanée ; *CsA+C* = souris traitées par ciclosporine sous-cutanée et par canrénoate per os. ; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$. Lors d'un traitement par ciclosporine (*CsA*), les souris présentent une augmentation de la concentration plasmatique d'urée (*A*) et des lésions histologiques de vacuolisation tubulaire (*B* et *C*) par rapport aux souris contrôles (*Ctrl*). Lorsque les souris sont aussi traitées par canrénoate (*CsA+C*), elles ne

présentent pas d'augmentation de la concentration plasmatique d'urée (A) et moins de lésions histologiques de vacuolisation tubulaire (B et C).

Cristian Amador a adapté le modèle de néphrotoxicité de la ciclosporine chez la souris au tacrolimus. L'antagonisme pharmacologique du RM (par le canrénoate) ne permet pas de prévenir la toxicité rénale induite par le tacrolimus (10mg/kg/j pendant 10 jours) jugée sur la fonction rénale et les lésions histologiques de vacuolisation tubulaire (**Figure 18**).

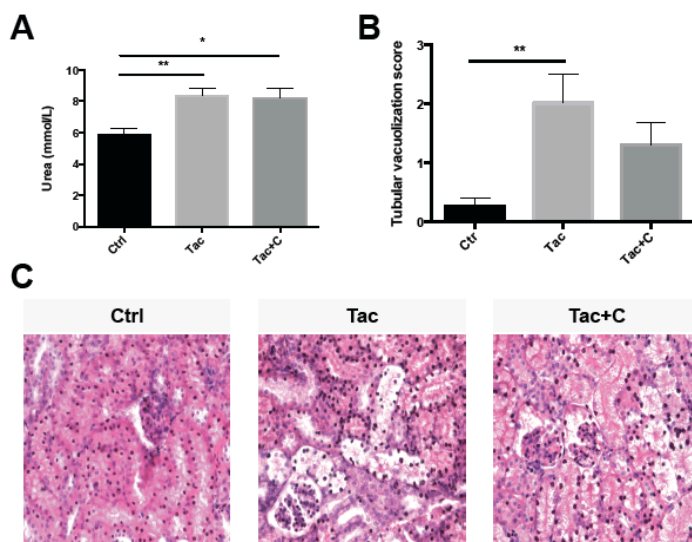


Figure 18. Antagonisme pharmacologique du Récepteur Minéralocorticoïde au cours de la néphrotoxicité du tacrolimus.

*Ctrl = souris contrôles ; Tac = souris traitées par tacrolimus sous-cutané ; Tac+C = souris traitées par tacrolimus sous-cutané et par canrénoate per os. ; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Lors d'un traitement par tacrolimus (Tac), les souris présentent une augmentation de la concentration plasmatique d'urée (A) et des lésions histologiques de vacuolisation tubulaire (B et C) par rapport aux souris contrôles (Ctrl). Lorsque les souris sont aussi traitées par canrénoate (Tac+C), elles présentent aussi une augmentation de la concentration plasmatique d'urée (A) et des lésions histologiques de vacuolisation tubulaire (B et C).*

Nous proposons que même si la ciclosporine et le tacrolimus présentent des profils similaires de néphrotoxicité, il est possible que celle induite par la ciclosporine puisse être prévenue par l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique du RM alors que celle induite par le tacrolimus ne puisse pas être prévenue. Il est par ailleurs possible que ces différences d'effets résident dans les différences conformationnelles d'inhibition de la CaN par la ciclosporine et le tacrolimus (cf. Ciclosporine et Tacrolimus, p. 15) : parmi les 25 résidus des

sous-unités A et B de la CaN impliqués, seulement 20 sont des sites d'interaction communs entre les complexes ciclosporine-CypA et tacrolimus-FKBP (30). Les 5 autres résidus spécifiques de chaque anticalcineurine impliqués dans l'interaction ciclosporine/tacrolimus-CaN pourraient modifier spécifiquement l'activité de la CaN et donc entraîner soit des effets différents dans l'ensemble des tissus soit des activités différentes en fonction des tissus/cellules. Il est donc possible que ceci explique pourquoi la ciclosporine induit une augmentation de la sensibilité aux agents vasoconstricteurs alors que le tacrolimus non.

Discussion

Ces résultats apportent des données originales sur l'intérêt de l'antagonisme pharmacologique du RM au cours de la néphrotoxicité induite par la ciclosporine d'une part et par le tacrolimus d'autre part : la néphrotoxicité de la ciclosporine peut, au moins en partie, être prévenue par l'utilisation d'un antagoniste du RM mais pas celle induite par le tacrolimus.

Ces résultats préliminaires présentent tout de même des limitations. La première concerne la dose des traitements utilisés. Si nous avons discuté et justifié plus haut la forte dose de ciclosporine utilisée dans notre modèle murin (p. 78), la dose de tacrolimus que nous utilisons ici chez la souris est beaucoup moins documentée dans la littérature. En effet, aussi bien en ce qui concerne les doses administrées – elles varient de 0,2mg/kg/j (232) à 12,5mg/kg/j (233) – que les durées d'injection – elles varient de 2 (233) à 14 jours (234) – utilisées, les modèles de néphrotoxicité du tacrolimus sont moins bien documentés que pour la ciclosporine chez la souris.

Concernant la comparaison des résultats entre tacrolimus et ciclosporine, la limitation qui nous paraît être la plus importante est l'équivalence de doses. En effet, si la stricte équivalence entre les doses de ciclosporine et de tacrolimus qu'il faut pour induire une immunosuppression efficace n'est pas connue, la dose seuil à partir de laquelle apparaissent les effets indésirables non immunosuppresseurs (comme la néphrotoxicité) est encore moins claire : pour un même patient, on ne connaît pas la dose d'équivalence entre tacrolimus et ciclosporine. En effet, si certaines études proposent un ratio de l'ordre de 30:1 (30mg/kg/j de ciclosporine pour 1mg/kg/j de tacrolimus) (235), d'autres proposent un ratio de 50:1 (236). Il n'est donc pas certain qu'une dose donnée de tacrolimus (ici, 10mg/kg/j) ne soit pas plus néphrotoxique qu'une dose de ciclosporine (ici, 100mg/kg/j) estimée équivalente : le seuil de toxicité atteint sous tacrolimus pourrait alors ne plus être réversible. Cela étant, le ratio de posologies entre notre modèle de néphrotoxicité de la ciclosporine et celui de néphrotoxicité du tacrolimus est de l'ordre de 10:1 donc largement en-dessous des précédents ratios cités ci-dessus.

Par ailleurs, si les mécanismes de néphrotoxicité de la ciclosporine sont encore imparfaitement connus, ceux associés au tacrolimus le sont encore moins. Il est possible que sa toxicité rénale soit moins (ou pas) reliée à une vasculotoxicité alors qu'il semble que ce

mécanisme soit central pour la ciclosporine. En effet, les patients traités par ciclosporine présentent une augmentation de la vasoconstriction intra-rénale (prévenue lors de l'utilisation d'antagonistes des canaux calciques) alors que cet effet n'est pas observé chez les patients traités par tacrolimus (237).

Afin d'étudier ces questions, il est nécessaire d'explorer les mécanismes cellulaires qui diffèrent entre la toxicité de la ciclosporine et celle du tacrolimus. La ciclosporine (*via* le résidu arginine en position 148 de la CypA) interagit spécifiquement avec le résidu arginine en position 122 de la CaN et induit une réorientation de la chaîne latérale de ce dernier, ce qui modifie l'activité catalytique de la CaN (30). Il est donc possible que cette activité catalytique de la CaN soit spécifiquement impliquée dans les vaisseaux et explique donc la différence dans les effets vasculaires observés entre la ciclosporine et le tacrolimus. Enfin, le tacrolimus diminue l'activité du canal calcique voltage-dépendant de type L (238) alors que la ciclosporine l'active (115, 116) : ceci justifie d'autant plus, l'implication des antagonistes du RM et des inhibiteurs calciques chez les patients traités par ciclosporine, et pas chez ceux traités par tacrolimus.

Article 3

Cet article clinique en préparation de soumission à la revue *Transplantation* rapporte les résultats de l'étude EpleCsAT: Safety (cf. Etude clinique p. 46) menée dans le service de Néphrologie du CHU de Reims.

Cette étude a été motivée par deux raisons principales : la première est que les maladies cardiovasculaires sont une complications importantes au cours de la transplantation et que peu d'interventions ont montré leur bénéfice dans cette population alors que les antagonistes du RM apportent un net bénéfice dans de nombreuses situations cliniques (cf. p. 29) ; la seconde est que la toxicité rénale de la ciclosporine pourrait être au moins en partie prévenue par l'utilisation d'un antagoniste du RM (cf. **Articles 1 et 2**) et permettre ainsi d'augmenter la durée de vie des transplants alors que nous sommes toujours en pénurie de donneurs.

Compte tenu que l'association ciclosporine et éplérénone était contre-indiquée (en raison de l'absence d'études spécifiques), nous ne pouvions d'emblée proposer une étude d'efficacité : il nous a donc fallu d'abord réaliser une étude de tolérance. Au cours de cette étude de phase II prospective, ouverte et non contrôlée, nous montrons que l'éplérénone peut être utilisée chez les patients transplantés rénaux à partir de 30 mL/min/1,73m² de DFG_e. Il y a eu peu d'évènements indésirables : seuls, 9 patients ont présenté une hyperkaliémie (>5mmol/L) qui n'a jamais menacé leur pronostic vital et un seul patient a dû être traité par résine échangeuse de potassium. Parmi ces patients, nous avons réussi à déterminer que les facteurs de risque de présenter une hyperkaliémie au cours d'un traitement par éplérénone sont principalement représentés par le fait d'avoir une kaliémie plus élevée et une bicarbonatémie plus basse à l'initiation du traitement.

Nous proposons donc que, lors de l'initiation d'un traitement par éplérénone, le seuil de 4,35mmol/L de kaliémie puisse être utilisé comme seuil marquant un sur-risque de développer une hyperkaliémie (>5mmol/L) sous traitement : au-delà de ce seuil, les patients ont un risque 6,5 fois plus important de présenter une hyperkaliémie (>5mmol/L). Chez ces patients, une surveillance plus rapprochée de la kaliémie devrait être mise en place.

Title

Safety use of Eplerenone in Cyclosporine A-treated kidney transplant recipients with impaired renal function

Authors

Jean-Philippe BERTOCCHIO^{1,3}, Coralie BARBE², Sylvie LAVAUD¹, Olivier TOUPANCE¹, Pierre NAZEYROLLAS², Frederic JAISSE³, Philippe RIEU¹

¹ Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, Reims University Hospital, Avenue Cognacq Jay, 51092 Reims CEDEX, France

² Biostatistic and methodology unit, Reims University Hospital, Avenue Cognacq Jay, 51092 Reims CEDEX, France

³ INSERM UMRS 1138 – Team 1, Research Centre of Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine, 75006 Paris CEDEX, France

Address for correspondence

Prof. Philippe RIEU

Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit,
Reims University Hospital, Avenue Cognacq Jay,
51092 Reims CEDEX, France

Tel: +33 3 26 78 76 38

Fax: +33 3 26 78 84 82

Mail: prieu@chu-reims.fr

Total word count: 2251

Funding

Funding was provided by an internal grant from the Reims University Hospital and a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Disclosure

J.-P.B.: the author declares no conflicts of interest

S.L.: the author declares no conflicts of interest

O.T.: the author declares no conflicts of interest

C.B.: the author declares no conflicts of interest

P.N.:

F.J.:

P.R.: the author declares no conflicts of interest

Contributions

J.-P.B. was responsible for all aspects of the study, including the study design, analysis and interpretation of results and writing the article. He received a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and declares no conflict of interest.

S.L. and O.T. were responsible for inclusions and follow-up for all patients and declare no conflict of interest.

C.B. was responsible for data analysis, interpretation of results, participated to the writing of the paper and declares no conflict of interest.

P.N. was responsible for the study design and statistical analysis.

F.J. was responsible for interpretation of results and funding.

P.R. was the Primary Investigator of the study, participated to the study design and the writing of the paper. He declares no conflict of interest.

Email addresses

J.-P.B.: zoroasthres@hotmail.com

S.L.: slavaud@chu-reims.fr

O.T.: otoupance@chu-reims.fr

C.B.: cbarbe@chu-reims.fr

P.N.: pnazeyrollas@chu-reims.fr

F.J.: frederic.jaisser@inserm.fr

P.R.: prieu@chu-reims.fr

Abbreviations

ACE-I: Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitors

ARB: type 2 Angiotensin Receptor Blockers

CNI: Calcineurin inhibitors

MR: Mineralocorticoid Receptor

MRA: MR Antagonists

Abstract (228 words)

Background. Chronic kidney disease patients are at the higher risk of cardiovascular death. Pathophysiology and assessment of such a risk in kidney transplant recipients remain still unknown: classical mechanisms are probably associated to immunological and therapeutic factors. Mineralocorticoid Receptor antagonists use arises in end-stage renal disease but are contra-indicated during renal impairment and when associated to several immunosuppressive drugs. We tested the tolerance of eplerenone in a cohort of kidney transplant recipients with an impaired renal function.

Methods. A single-centre prospective open label trial was performed. The primary endpoint was the tolerance of eplerenone assessed by its adverse events: hyperkalemia, metabolic acidosis, hypotension, acute kidney failure or any adverse event requiring the discontinuation of the drug. All patients had to be treated 8 weeks and the dose of 25mg/d was chosen.

Results. 9 patients experienced at least one episode of hyperkalemia ($>5\text{mmol/L}$) and only one had to use potassium-exchange resin. Only one acute kidney injury occurred. Basal kalemia and bicarbonatemia was independently associated to a higher risk of developing hyperkalemia under treatment. A 4.35mmol/L cut-off for basal kalemia was the best factor to predict the risk of hyperkalemia under treatment.

Conclusions. Eplerenone could be safely used in kidney transplant recipients if kalemia is closely monitored. When renal function is impaired, if kalemia is higher than 4.35mmol/L , clinicians should be much more careful and highlight the importance of dietetic.

Main body

Introduction

Chronic kidney disease patients are at a higher risk of cardiovascular diseases and mortality than the general population (1). Even if cardiovascular risk seems better after renal transplantation (2), it remains unacceptable (3, 4). Pathophysiology and assessment of cardiovascular risk is not as clear as in the general population (5). Classical cardiovascular risk factors may be involved but also allograft-specific inflammation and chronic kidney disease-related uremic toxins. Several strategies have been tested to reduce both cardiovascular mortality and morbidity in such a population but classical interventions such as the use of renin-angiotensin system blockers (like angiotensin converting enzyme inhibitors ACE-I and/or type 2 angiotensin receptor blockers ARB) are not efficient (6). New drugs are still needed. Pharmacological antagonism of Mineralocorticoid Receptor (MR) is highly efficient to reduce both cardiovascular and all-cause morbidity and/or mortality during chronic heart failure (7) after (or not) myocardial infarction (8). Despite its contra-indication in patients experiencing chronic kidney disease, eplerenone (a MR antagonist, MRA) could be safely used in such a population if a close monitoring of kalemia, renal function and adverse events is managed (9) as well as during spironolactone (another MRA) use (10). During end-stage renal disease, spironolactone also reduces morbidity and mortality in hemodialyzed patients (11) and could be safely used in peritoneal dialysis patients (12). During kidney transplantation, MRA could not be commonly used because of immunosuppressive therapy. Calcineurin inhibitors (CNI) are the most commonly used drugs and remain the basis of maintenance immunosuppression during kidney transplantation (13). Both tacrolimus

and cyclosporine A increase the risk of developing hyperkalemia during transplantation (14), especially after adding ACE-I or ARB (15). Gonzalez Monte *et al.* has shown the benefit of adding spironolactone to dual-blockade of renin-angiotensin-aldosterone system (by both ACE-I and ARB) in 11 kidney transplant recipients experiencing persistent proteinuria: after 6 months, proteinuria decreased safely (16). Renal function was estimated higher than 50mL/min/1.73m². CNI use during kidney transplantation could also be associated to renal tubular acidosis in about one third of patients (17). MRA worsen metabolic acidosis especially when pre-existing (18).

MRA have never been tested during kidney transplantation with impaired renal function (<50mL/min/1.73m²): a specific condition prone to induce both hyperkalemia and metabolic acidosis. Here, we tested the tolerance of eplerenone in such a population.

Materials and Methods

We conducted a single-centre, prospective open label trial where the primary endpoint was the tolerance of eplerenone assessed by the development of its adverse events: major hyperkalemia (>6mmol/L), metabolic acidosis, hypotension, acute kidney failure or any event requiring the discontinuation of eplerenone. We calculated the number of patients to include upon the risk of developing the major adverse event: major hyperkalemia (>6mmol/L). In our population, a risk higher than 15% of developing such an event was supposed unacceptable to further study. The power to detect this adverse event has been fixed to 90%. Otherwise in such conditions, the risk of not highlighting an unacceptable hyperkalemia under eplerenone use in those patients is less than 10%; even if the tolerance allows it, the

risk of deciding to not use eplerenone is about 27%. Under these hypotheses, we had to include 31 patients.

We purchased a study by adapting a 2-steps Simon's plan (**Figure 1**) (19). During the first step, 14 patients were included at 25mg/d during 8 weeks. If 3 or more adverse events requiring the discontinuation of eplerenone occur, the study would be stopped. On the contrary, 17 more patients would be included during the step 2 at the same posology for 8 more weeks. If more than 4 adverse events requiring the discontinuation of eplerenone occur, the alternate hypothesis could not be rejected and the study would be stopped. On the contrary, we could conclude to a safety use of eplerenone 25mg/d.

All included patients had to: be more than 18-years old at the date of inclusion; be in a full legal capacity; belong to a health care system; give their written consent; present a functional kidney allograft for at least 1 year from the date of inclusion; be under cyclosporine A-treatment and present an impaired renal function estimated by the MDRD formula between 30 to 50mL/min/1.73m². They had to fulfil no one of the following conditions: serum potassium ≥ 5 mmol/L at the date of inclusion; one or more history of severe hyperkalemia (serum potassium ≥ 6 mmol/L) whatever the reason; currently under potassium exchange resin treatment; on-going pregnancy or lack of effective contraception during all the study; uncontrolled high arterial blood pressure; orthostatic hypotension; systolic arterial blood pressure ≤ 110 mmHg; heart failure within the past 3 months before the date of inclusion or chronic heart failure (NYHA III or IV); severe hepatic failure (Child-Pugh C); allergy to one or more of the components of the speciality eplerenone – INSPRA[®]; on-going treatment including spironolactone or eplerenone; on-going treatment that could not be withdrawn during the study period: potassium sparing diuretics, potassium salts, CYP3A4 enzymatic

inhibitors; malabsorption syndrome; abnormal galactose metabolism or a deficiency in galactase; on-going non steroidal anti-inflammatory treatment or lithium or another nephrotoxic agent or on-going treatment with a double-blockade by ACE-I and ARB.

Clinical parameters (body weight, blood pressure and adverse events) were monitored at day 0 (d0), d14, d28 and d56. Kalemia was closely monitored at d0, d2, d7, d14, d21, d28, d35, d42, d49 and d56. Other biological parameters (such as creatininemia and bicarbonatemia) were monitored at d0, d14, d28 and d56.

At any time of the study period, adverse events requiring the discontinuation of the treatment included: hyperkalemia $>6\text{mmol/L}$; hyperkalemia $> 5.5\text{mmol/L}$ under potassium-exchange resin; metabolic acidosis assessed by a bicarbonatemia $<15\text{mmol/L}$ and any clinical outcome requiring the discontinuation of the drug.

This trial received a specific agreement by an independent ethic committee and was registered to the European registry (EudraCT 2011-003759-20) and to clinicaltrials.gov (NCT01834768).

Statistical analysis

Quantitative data were described as means \pm standard deviation (SD) and qualitative data as number and percentage. Mean differences between kalemia at different times were evaluated using the Student paired *t*-test. Comparison between patients with kalemia $>5\text{mmol/L}$ and patients without kalemia $>5\text{mmol/L}$ was performed using univariate analysis (Student *t*-test, Wilcoxon test, χ^2 test or Fischer's exact test, as appropriate) and multivariate analysis (stepwise logistic regression, with enter and removal limits set at 0.10 and factors significant at $p=0.10$ included). Sensitivity and specificity of kalemia for the occurrence of kalemia $>5\text{mmol/L}$ were calculated, and a receiver operating characteristic (ROC) curve was calculated to determine a cut-off value with optimal sensitivity and specificity. Whatever the test used, a *p*-value <0.05

was considered significant. All statistical analyses were performed using SAS software release 9.3 (SAS INC, Cary, California).

Results

31 patients were included (**Table 1**) and everyone fulfil all the study period (8 weeks) except one (last follow-up at d35). Kalemia increased slightly from a baseline of $4.2 \pm 0.4 \text{ mmol/L}$: at d2, a drop in kalemia occurred and then was maintained in a plate manner (**Figure 2A**). 9 patients experienced at least one episode of hyperkalemia ($>5 \text{ mmol/L}$) and only one an episode of kalemia $>5.5 \text{ mmol/L}$. As planned, this patient needed a specific intervention (potassium-exchange resin) at d35. Half hyperkalemias ($>5 \text{ mmol/L}$) occurred within 7 days after beginning the treatment (data not shown).

Three patients presented other adverse events: two unspecific outcomes and one acute kidney injury ($>30\%$ -increased creatininemia from baseline) at d56. None of these adverse events needed specific management. We observed no modifications in systolic blood pressure (**Figure 2B**), body weight (**Figure 2C**) and bicarbonatemia (**Figure 2D**). No more modifications were found in other biological or clinical parameters.

Then, the risk for presenting at least one episode of hyperkalemia ($>5 \text{ mmol/L}$) under eplerenone was studied from data at baseline (**Table 2**). Demographic and biological parameters were analysed and also drug therapies: only kalemia, bicarbonatemia, creatininemia and cyclosporin posology at baseline appeared relevant under univariate analysis. After a stepwise multivariate analysis, only kalemia and bicarbonatemia at baseline were independently associated to a higher risk of developing at least one episode of hyperkalemia under treatment. The higher

kalemia at baseline was associated to a higher risk of developing hyperkalemia (OR 6.5 [1.4;30.5]) and the lower bicarbonatemia was associated to a higher risk of hyperkalemia (OR 0.7 [0.5;0.9]).

ROC analysis was performed to test if a cut-off for kalemia and/or bicarbonatemia at baseline could allow distinguishing which patients are at a higher risk to develop an hyperkalemia under treatment: only kalemia at baseline (**Figure 3A**) showed good specificity and sensitivity and not basal bicarbonatemia at baseline (**Figure 3B**). A kalemia $>4.35\text{mmol/L}$ at baseline was a marker of a higher risk to develop hyperkalemia ($>5\text{mmol/L}$) during the treatment period with a sensitivity of 78% and a specificity of 77%.

Discussion

During this trial, we have shown that eplerenone could be safely used in kidney transplant recipients even if they are under cyclosporine A-treatment and experience an impaired renal function. On the other hand, MRA have been told to be unsafe (20), especially in chronic renal disease patients (21, 22) due to a supposed higher risk of developing both hyperkalemia and metabolic acidosis.

CNI (mainly used drugs in kidney transplantation) decrease the effects of loop diuretics (like furosemide) (23), activate the sodium-chloride cotransporter (NCC) (24, 25) and decrease ROMK channels (26): this could partially explain the mechanisms of CNI-induced hyperkalemias. Cyclosporine A (one CNI) also induces metabolic acidosis (27) that could worsen potassium transfers from intracellular to extracellular compartment (28): distal renal tubular acidosis (29) appears to be related to Na^+/K^+ ATPase pump impairment (30) under cyclosporine A-treatment. Moreover, this metabolic acidosis could also be related to a mineralocorticoid resistance (31).

Renal impairment was chosen to be one of the worse conditions to increase the risk of hyperkalemia: during CKD, renal potassium handling increases as glomerular filtration rate decreases (32) leading to hyperkalemia due to a loss of nephron mass (28). In our study, hyperkalemia was not associated with a higher kaliuresis nor at baseline or during the follow-up: at a steady state, kaliuresis reflects potassium intake and is not related to a higher risk of developing hyperkalemia like in a previous study (33). During previous clinical trials, the risk of developing hyperkalemia under eplerenone is less than 10% in both hypertension and cardiac failure indications, depending on the definition of hyperkalemia ($>5.5\text{mmol/L}$ or 6mmol/L) and the drug posology (34). Over the clinical trials, hyperkalemias have been reported to a lack of laboratory monitoring (kalemia and renal function) after MRA initiation (35).

Even if our cohort is of little size ($n=31$), kalemia at baseline was associated to a higher risk of developing hyperkalemia ($>5\text{mmol/L}$) during the treatment period (**Table 2**). It allowed finding a cut-off to evaluate the risk of developing such an event: 4.35mmol/L at baseline had both the best sensitivity and specificity (**Figure 3A**). A previous study has also reported that, during hypertension therapy, predictor factors for developing hyperkalemia ($>5.5\text{mmol/L}$) under MRA treatment were $\text{eGFR} < 45\text{mL/min/1.73m}^2$ and baseline kalemia $>4.5\text{mmol/L}$ (36): this is consistent to our findings. Such a data is easy to use in clinical practice, especially when hyperkalemia is feared.

Beneficial effects of MRA have been well established during heart failure with strong data during randomized controlled trials, especially when cardiac ejection fraction is reduced (37): both eplerenone and spironolactone have demonstrated survival benefit. During chronic kidney disease, MRA use is associated to beneficial effects on proteinuria (38); as proteinuria is a good biomarker of kidney disease progression,

a benefit on kidney survival could be expected but has never been demonstrated due to a lack of randomized controlled trials. Finally, MRA could be useful during cyclosporine A-induced nephrotoxicity (39): both drugs (MRA and cyclosporine A) act on vascular function and MRA could be the antidote of cyclosporine A vasculotoxicity. Several animal studies (and personal data) suggest a beneficial effect of MRA use under cyclosporine A-treatment (46-49). Such an effect could be related to the vascular MR-induced remodelling (50).

Beneficial effects of MRA have been related not to their pleiotropic actions (e.g. on cardiac remodelling by modifying gene expressions like previously reported (40)) but to their diuretic effects (38). In our study, no effect was observed neither on (systolic, diastolic or mean) blood pressure (**Figure 2B**) nor on body weight (**Figure 2C**). This is consistent to previous studies: during end stage renal disease in anuric hemodialyzed patients, MRA use is efficient to reduce mortality without diuretic effect (11) and the post-hoc analysis of EPHESUS trial has shown that the beneficial effects of eplerenone are independent of its diuretic effect (41).

In our study, MRA posology was low but efficient to increase kalemia (**Figure 1A**). The dose-efficiency has been demonstrated for both spironolactone (42) and eplerenone (43) in controlling. Moreover, electrolyte disturbances (hyperkalemia) appear to be also dose-dependant (37). Survival benefits have been shown with low posologies: means were 26mg/d for eplerenone during RALES trial (44) and 42mg/d and 39mg/d during EPHESUS (8) and EMPHASIS-HF (7) trials, respectively). Such a low dose has been shown to be efficient during end stage renal disease in both hemodialyzed (11) and peritoneal dialysis (12) patients. All these data are consistent to the posology we chose: it appears to be the best compromise between the higher efficacy and the lower toxicity in our population.

Taken together, our data show a safety use of eplerenone during renal impairment: this is consistent to a previous study (10) and this is the first study performed in kidney transplant recipients.

Further studies are needed to underline the beneficial effect of MRA use during kidney allograft transplantation: a randomized controlled trial should test the efficiency of eplerenone to prevent/reduce chronic renal allograft dysfunction and/or the benefit on (graft and/or overall) survival.

Acknowledgements

References

1. Ortiz A, Covic A, Fliser D, et al. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet*. 2014; 383(9931):1831
2. Pilmore H, Dent H, Chang S, McDonald SP, Chadban SJ. Reduction in cardiovascular death after kidney transplantation. *Transplantation*. 2010; 89(7):851
3. Berthoux F, Mariat C. Cardiovascular death after renal transplantation remains the first cause despite significant quantitative and qualitative changes. *Transplantation*. 2010; 89(7):806
4. Stoumpos S, Jardine AG, Mark PB. Cardiovascular morbidity and mortality after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014;
5. Glicklich D, Vohra P. Cardiovascular risk assessment before and after kidney transplantation. *Cardiol Rev*. 2014; 22(4):153
6. Opelz G, Dohler B. Cardiovascular death in kidney recipients treated with renin-angiotensin system blockers. *Transplantation*. 2014; 97(3):310
7. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011; 364(1):11
8. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003; 348(14):1309
9. Rossignol P, Dobre D, McMurray JJ, et al. Incidence, determinants, and prognostic significance of hyperkalemia and worsening renal function in patients with heart failure receiving the mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone or placebo in addition to optimal medical therapy: results from the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Circ Heart Fail*. 2014; 7(1):51

10. Edwards NC, Steeds RP, Chue CD, Stewart PM, Ferro CJ, Townend JN. The safety and tolerability of spironolactone in patients with mild to moderate chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2012; 73(3):447
11. Matsumoto Y, Mori Y, Kageyama S, et al. Spironolactone reduces cardiovascular and cerebrovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(6):528
12. Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, et al. Long-term effects of spironolactone in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25(5):1094
13. Menon MC, Murphy B. Maintenance immunosuppression in renal transplantation. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13(4):662
14. Kaplan B, Wang Z, Abecassis MM, Fryer JP, Stuart FP, Kaufman DB. Frequency of hyperkalemia in recipients of simultaneous pancreas and kidney transplants with bladder drainage. *Transplantation*. 1996; 62(8):1174
15. Mitterbauer C, Heinze G, Kainz A, Kramar R, Horl WH, Oberbauer R. ACE-inhibitor or AT2-antagonist therapy of renal transplant recipients is associated with an increase in serum potassium concentrations. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(5):1742
16. Gonzalez Monte E, Andres A, Polanco N, et al. Addition of spironolactone to dual blockade of renin angiotensin system dramatically reduces severe proteinuria in renal transplant patients: an uncontrolled pilot study at 6 months. *Transplant Proc*. 2010; 42(8):2899
17. Keven K, Ozturk R, Sengul S, et al. Renal tubular acidosis after kidney transplantation--incidence, risk factors and clinical implications. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22(3):906

18. Henger A, Tutt P, Riesen WF, Hulter HN, Krapf R. Acid-base and endocrine effects of aldosterone and angiotensin II inhibition in metabolic acidosis in human patients. *J Lab Clin Med*. 2000; 136(5):379
19. Simon R. Optimal two-stage designs for phase II clinical trials. *Control Clin Trials*. 1989; 10(1):1
20. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, et al. Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med*. 2004; 351(6):543
21. Hernandez AF, Mi X, Hammill BG, et al. Associations between aldosterone antagonist therapy and risks of mortality and readmission among patients with heart failure and reduced ejection fraction. *JAMA*. 2012; 308(20):2097
22. Vardeny O, Claggett B, Anand I, et al. Incidence, predictors, and outcomes related to hypo- and hyperkalemia in patients with severe heart failure treated with a mineralocorticoid receptor antagonist. *Circ Heart Fail*. 2014; 7(4):573
23. Hocheil K, Kees F, Kramer BK, Kurtz A. Cyclosporine A attenuates the natriuretic action of loop diuretics by inhibition of renal COX-2 expression. *Kidney Int*. 2004; 65(6):2071
24. Melnikov S, Mayan H, Uchida S, Holtzman EJ, Farfel Z. Cyclosporine metabolic side effects: association with the WNK4 system. *Eur J Clin Invest*. 2011; 41(10):1113
25. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med*. 2011; 17(10):1304

26. Zhang Y, Lin DH, Wang ZJ, Jin Y, Yang B, Wang WH. K restriction inhibits protein phosphatase 2B (PP2B) and suppression of PP2B decreases ROMK channel activity in the CCD. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294(3):C765
27. Stahl RA, Kanz L, Maier B, Schollmeyer P. Hyperchloremic metabolic acidosis with high serum potassium in renal transplant recipients: a cyclosporine A associated side effect. *Clin Nephrol*. 1986; 25(5):245
28. Palmer BF. Regulation of Potassium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;
29. Heering P, Grabensee B. Influence of ciclosporin A on renal tubular function after kidney transplantation. *Nephron*. 1991; 59(1):66
30. Tumlin JA, Sands JM. Nephron segment-specific inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity by cyclosporin A. *Kidney Int*. 1993; 43(1):246
31. Heering PJ, Kurschat C, Vo DT, Klein-Vehne N, Fehsel K, Ivens K. Aldosterone resistance in kidney transplantation is in part induced by a down-regulation of mineralocorticoid receptor expression. *Clin Transplant*. 2004; 18(2):186
32. Moranne O, Froissart M, Rossert J, et al. Timing of onset of CKD-related metabolic complications. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20(1):164
33. Smyth A, Dunkler D, Gao P, et al. The relationship between estimated sodium and potassium excretion and subsequent renal outcomes. *Kidney Int*. 2014; 86(6):1205
34. Danjuma MI, Mukherjee I, Makaronidis J, Osula S. Converging indications of aldosterone antagonists (spironolactone and eplerenone): a narrative review of safety profiles. *Curr Hypertens Rep*. 2014; 16(2):414

35. Allen LA, Shetterly SM, Peterson PN, et al. Guideline concordance of testing for hyperkalemia and kidney dysfunction during initiation of mineralocorticoid receptor antagonist therapy in patients with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2014; 7(1):43
36. Khosla N, Kalaitzidis R, Bakris GL. Predictors of hyperkalemia risk following hypertension control with aldosterone blockade. *Am J Nephrol*. 2009; 30(5):418
37. Zannad F, Gattis Stough W, Rossignol P, et al. Mineralocorticoid receptor antagonists for heart failure with reduced ejection fraction: integrating evidence into clinical practice. *Eur Heart J*. 2012; 33(22):2782
38. Bertocchio JP, Warnock DG, Jaisser F. Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011; 79(10):1051
39. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(1):F2
40. Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, et al. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension*. 2013; 61(2):361
41. Rossignol P, Menard J, Fay R, Gustafsson F, Pitt B, Zannad F. Eplerenone survival benefits in heart failure patients post-myocardial infarction are independent from its diuretic and potassium-sparing effects. Insights from an EPHESUS (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study) substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58(19):1958
42. RALES. Effectiveness of spironolactone added to an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a loop diuretic for severe chronic congestive heart failure (the Randomized Aldactone Evaluation Study [RALES]). *Am J Cardiol*. 1996; 78(8):902

43. Weinberger MH, Roniker B, Krause SL, Weiss RJ. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension. *Am J Hypertens*. 2002; 15(8):709
44. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999; 341(10):709
45. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4(2):481
46. Feria I, Pichardo I, Juarez P, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int*. 2003; 63(1):43
47. Macunluoglu B, Arikan H, Atakan A, et al. Effects of spironolactone in an experimental model of chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*. 2008; 40(1):273
48. Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, et al. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292(1):F131
49. Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, et al. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289(5):F1020
50. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, et al. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension*. 2014; 63(3):520

Table 1. Characteristics of included patients. M: Male; F: Female; eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate; MMF: Mycophenolate Mofetil. Data are expressed by their mean \pm Standard Deviation (SD).

Demography

Age (years)	51.99 \pm 11.47
Sex ratio (M/F)	18/13
Time since transplantation (months)	144.58 \pm 82.58
Body Mass Index at inclusion (kg/m ²)	24.88 \pm 3.74
Diabetes n (%)	3 (10)

Biology

Creatininemia (μ mol/L)	148.61 \pm 37.92
eGFR (mL/min/1,73m ²)	41.23 \pm 9.66
Kalemia at inclusion (mmol/L)	4.2 \pm 0.4
Bicarbonatemia at inclusion (mmol/L)	23.3 \pm 3.8
Natriuresis at inclusion (mmol/d)	144.3 \pm 61.1
Kaliuresis at inclusion (mmol/d)	62.8 \pm 34.4
Proteinuria at inclusions (mg/d)	172.1 \pm 143.5

Drug therapies

Cyclosporine posology at inclusion (mg/kg/d)	2.16 \pm 0.54
Cyclosporinemia at inclusion (ng/mL)	91.26 \pm 30.35
MMF/azathioprine	24/4
ACE-i/ARB (n/n)	13/6
Diuretics n (%)	12 (39)
β -blockers n (%)	14 (45)
Oral bicarbonate n (%)	7 (23)
Steroids n (%)	5 (16)

Table 2. Candidate parameters for predicting the risk of hyperkalemia. M: Male; F: Female; eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate; OR: Odd Ratio; CI: Confidence Interval. Data are expressed by their mean \pm Standard Deviation (SD).

Parameter	Kalemia > 5mmol/L (n=9)	No-kalemia > 5 mmol/L (n=22)	Univariate analysis (p)	Multivariate analysis (p)	OR	95%CI
Demography						
Age (years)	48.71 \pm 14.33	53.34 \pm 10.16	0.31			
Sex (M/F)	7/2	11/11	0.12			
Body weight (kg)	75.79 \pm 6.34	70.68 \pm 13.72	0.17			
Body Mass Index (kg/m ²)	24.62 \pm 1.78	24.99 \pm 4.33	0.84			
Diabetes at inclusion (n)	0	3	0.34			
Time since transplantation (months)	170.56 \pm 100.73	133.95 \pm 73.96	0.29			
Systolic Blood Pressure (mmHg)	125.0 \pm 11.46	128.64 \pm 8.19	0.42			
Biology						
Creatininemia at day 0 (μ mol/L)	170.11 \pm 35.71	139.82 \pm 35.91	0.06			
eGFR (mL/min/1.73m ²)	37.56 \pm 8.82	42.73 \pm 9.77	0.17			
Kalemia at day 0 (mmol/L)	4.57 \pm 0.33	4.09 \pm 0.31	<0.01	0.003	6.5	[1.4;30.5]
Kaliuresis (mmol/24h)	66.33 \pm 17.67	61.32 \pm 39.59	0.33			
Kaliuresis/creatininuria (mmol/mmol)	4.41 \pm 2.05	5.92 \pm 4.51	0.57			
Natriuresis (mmol/24h)	155.67 \pm 69.05	153.18 \pm 81.03	0.84			
Natriuresis/creatininuria (mmol/mmol)	9.42 \pm 4.22	15.98 \pm 15.61	0.25			
Bicarbonatemia at day 0 (mmol/L)	20.56 \pm 4.10	24.45 \pm 3.05	0.02	0.007	0.7	[0.5;0.9]

Drug therapy

Cyclosporine posology at inclusion (mg/d)	167.78±32.32	148.18±42.16	0.08
Cyclosporine posology at inclusion (mg/kg/d)	2.22±0.42	2.13±0.59	0.37
Cyclosporinemia at inclusion (ng/mL)	93.44±35.32	90.36±28.94	0.81
ACE-I at inclusion (n)	3	10	0.26
ARB at inclusion (n)	2	4	0.36
Diuretics at inclusion (n)	4	8	0.29
β-blockers at inclusion (n)	4	10	0.31
Oral bicarbonate at inclusion (n)	2	4	0.36
Steroids at inclusion (n)	1	4	0.39

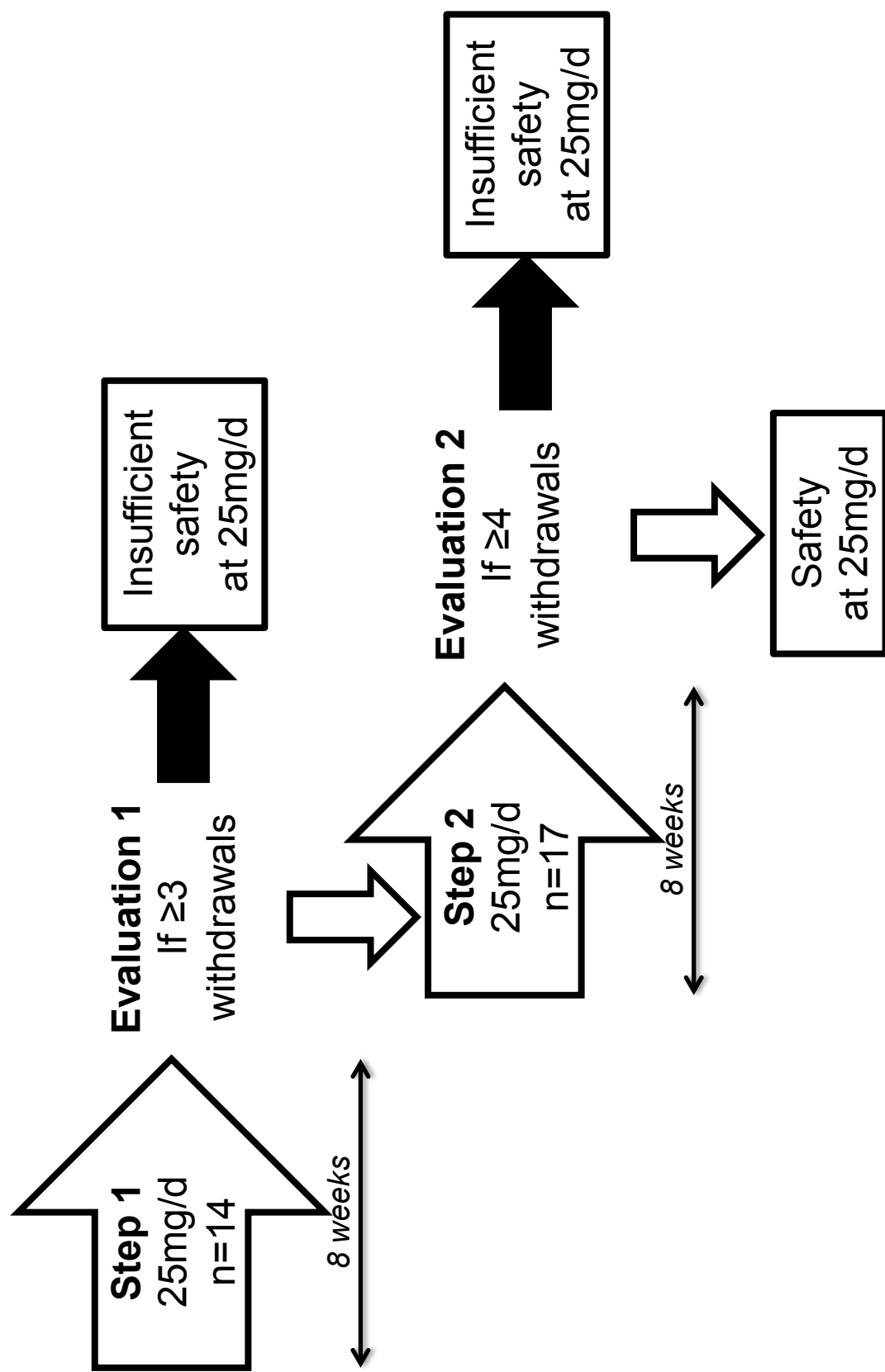


Figure 1. Design of the EpleCsAT: Safety trial. A sequential inclusion were performed: 14 patients during step 1; then 17 new patients during step 2.

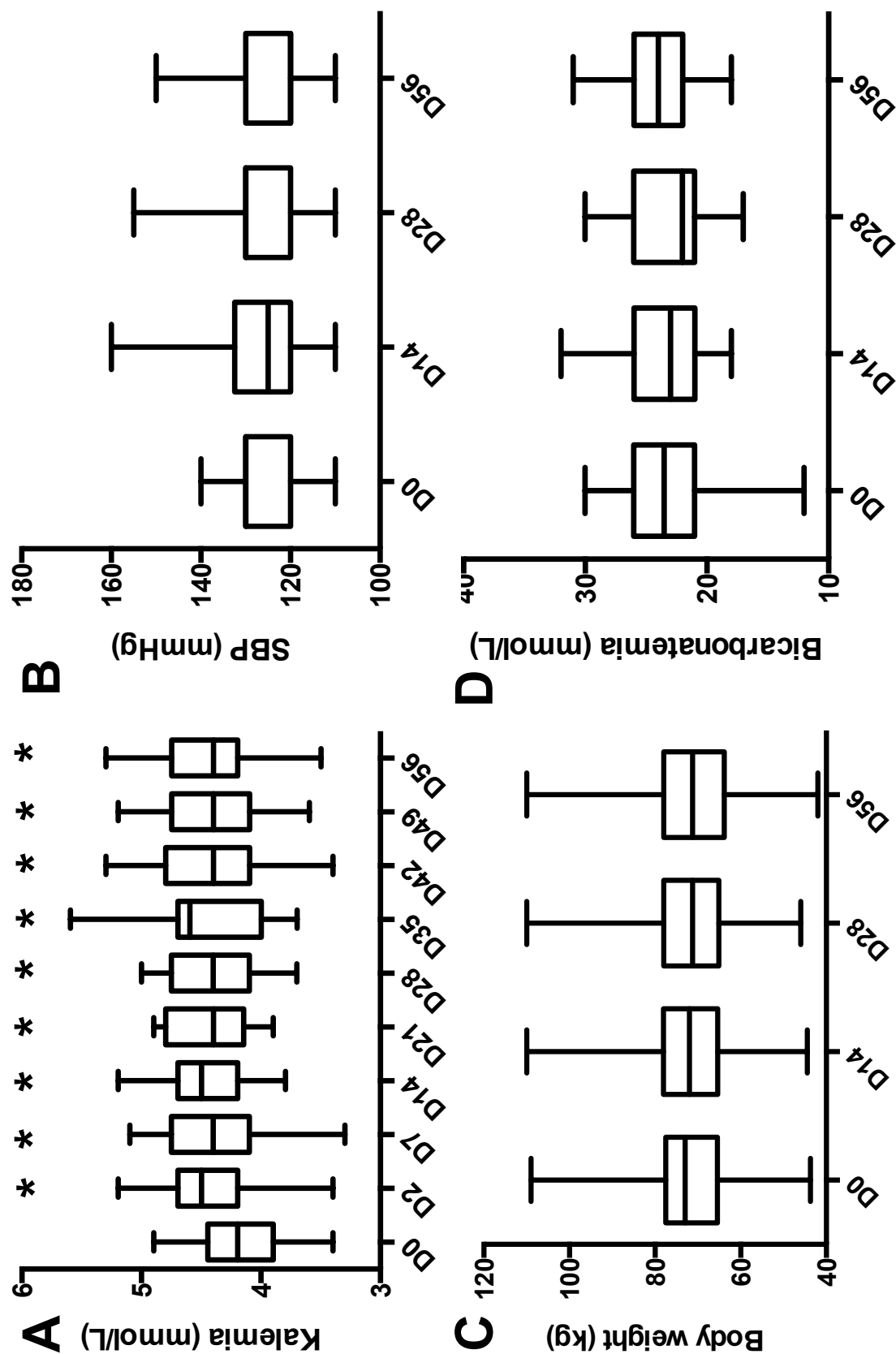
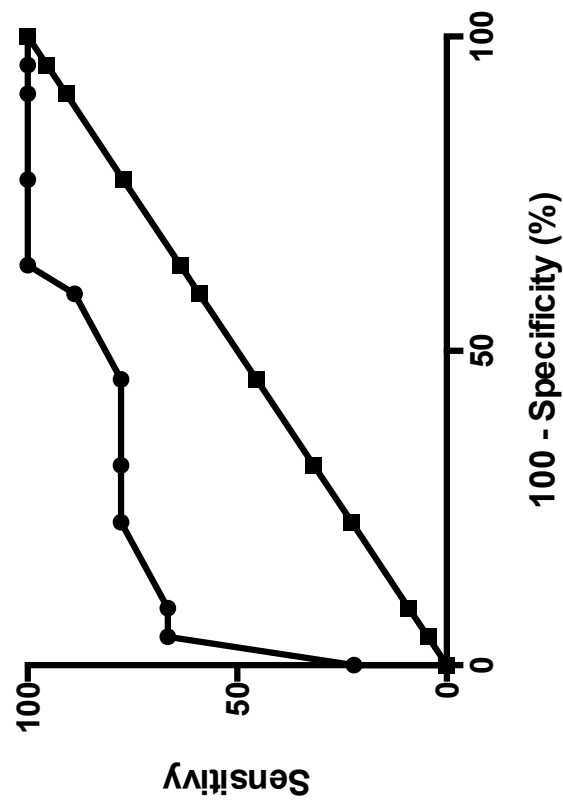


Figure 2. Eplerenone induced hyperkalemia. (A) Kalemia increased from day 2 (D2) and became stable during the treatment period. (B) Systolic Blood Pressure (SBP), (C) Body weight and (D) Bicarbonatemia did not change during the treatment period.

A



B

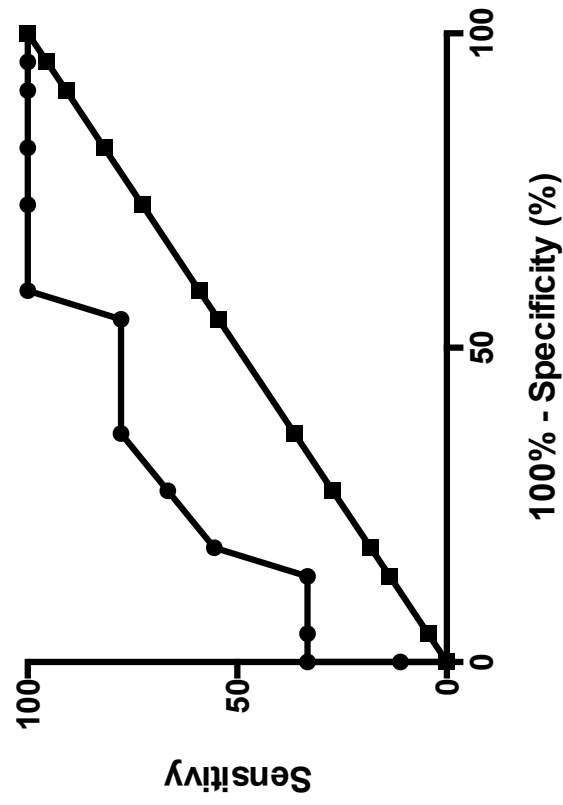


Figure 3. Risk factors to develop hyperkalemia under treatment. Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for (A) Kalemia and (B) Bicarbonatemia at baseline.

Discussion

L'ensemble de ces résultats apporte des données originales sur la tolérance de l'éplérénone non seulement chez les patients transplantés mais aussi en association à la ciclosporine et chez les patients insuffisants rénaux.

Cette étude a été menée au sein d'une population homogène de patients traités dans le même centre de transplantation rénale avec les mêmes habitudes de pratiques cliniques. Une des limitations principales de cette étude tient dans le fait qu'il s'agit justement d'une population très sélectionnée : ces patients transplantés depuis longtemps (en moyenne 12 ans) ne devaient jamais avoir présenté d'hyperkaliémie menaçante ($\geq 6\text{mmol/L}$). Ceci soutient l'idée qu'il s'agit de patients particulièrement observant des consignes diététiques même si l'association entre apports potassiques et hyperkaliémie n'a pas clairement été démontrée (239).

Parmi les autres effets indésirables, nous suspicions la survenue d'une acidose métabolique, une diminution de la pression artérielle voire une insuffisance rénale aiguë compte tenu des effets diurétiques des antagonistes du RM : seuls deux patients ont présenté une augmentation de la créatininémie ($>30\%$ par rapport à la valeur à l'initiation du traitement) qui n'a d'ailleurs pas été relevée par le néphrologue au moment de la visite de suivi. Il n'y a eu par ailleurs aucune modification du poids, de la bicarbonatémie ni de la pression artérielle au cours du traitement.

Enfin, la dose utilisée dans cette étude était faible (25mg/j) : ceci explique certainement le faible nombre d'événements indésirables survenus au cours de l'étude. Compte tenu de l'augmentation de la kaliémie dans notre population, nous pouvons conclure que même à cette posologie il existe un antagonisme pharmacologique du RM. D'ailleurs, les grandes études de morbi-mortalité (139-143) utilisant des antagonistes du RM utilisaient elles aussi de faibles doses de médicaments (de 25 à 50mg/j). Ceci était fondé sur le fait que de très faibles doses de spironolactone ($12,5\text{mg/j}$) permettaient d'obtenir un antagonisme du RM avec peu d'effets indésirables (240) lors de l'évaluation de la dose nécessaire à ce qui devait être la future étude RALES (139) qui allait marquer un tournant dans la prise en charge des patients insuffisants cardiaques.

Au total, ces données originales permettent de proposer une/des étude(s) prospective(s) randomisée(s) en aveugle sur l'efficacité de l'éplérénone chez les patients transplantés rénaux traités par ciclosporine présentant une fonction rénale supérieure ou égale à 30mL/min/1,73m^2

selon la formule MDRD. Il faudra que ces études comportent une partie spécifique de surveillance de la survenue des effets indésirables en aveugle afin de confirmer ces résultats.

Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons montré que la néphrotoxicité de la ciclosporine impliquait le RM des CMLV (**Article 1**) : les effets cellulaires de la ciclosporine et du RM dans la CMLV convergent sur l'activité du canal calcique voltage-dépendant de type L (cf. p. 81). Afin de prouver que l'effet bénéfique observé au cours de l'invalidation génique du RM dans les CMLV implique directement ce canal, il faudrait que l'antagonisme pharmacologique du canal calcique voltage-dépendant de type L au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine n'apporte pas de bénéfice chez les souris invalidées pour le RM dans les CMLV en terme de lésions et de fonction rénales induites par la ciclosporine. Une prochaine expérimentation pourrait comparer des souris traitées par ciclosporine \pm invalidées pour le RM dans les CMLV \pm traitées par un inhibiteur du canal calcique voltage dépendant de type L (par exemple l'amlodipine) : les souris traitées par amlodipine et invalidées pour le RM dans les CMLV ne devraient pas avoir de bénéfice supplémentaire par rapport à celles non traitées par l'amlodipine ; en revanche, les souris non invalidées pour le RM et traitées par amlodipine devraient avoir un bénéfice s'approchant de celui conféré par l'invalidation du RM dans les CMLV.

Par ailleurs, ces effets bénéfiques expliqués au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine ne sont pas retrouvés au cours de la néphrotoxicité induite par le tacrolimus (**Article 2**). Il existe des mécanismes de toxicité différents pour les deux anticalcineurines : notamment leurs effets vasculaires. Il est probable que l'inhibition de l'activité de la CaN dans la CMLV (soit en terme d'intensité soit en terme de mécanismes) soit différente entre ces deux immunosuppresseurs. Afin d'élucider ces différences de toxicité, au cours d'une étude ultérieure, il faudrait tester les différents effets cellulaires de la ciclosporine et du tacrolimus sur les CMLV. Les mécanismes à explorer plus particulièrement sont ceux impliquant les voies de signalisation liées au calcium (le relargage depuis les réserves cellulaires par les récepteurs à la ryanodine et à l'inositol triphosphate et l'entrée depuis le milieu extracellulaire par les canaux calciques membranaires). L'activité de la CaN devrait être spécifiquement étudiée : comme il s'agit d'une phosphatase, il est possible que son inhibition permette le maintien de protéines phosphorylées dans un cas et pas dans l'autre. Les retentissements sur le métabolisme cellulaire des CMLV seraient alors différents : dans un cas (celui de la ciclosporine), il y a une augmentation de la sensibilité aux agents

Conclusion

Ces travaux démontrent que la néphrotoxicité de la ciclosporine :

- peut être prévenue par l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique du RM
- alors que celle du tacrolimus ne peut pas être prévenue par l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique du RM
- implique une toxicité vasculaire
- implique le RM des CMLV
- l'éplérénone peut être utilisée chez les patients transplantés rénaux traités par ciclosporine même s'ils présentent une fonction rénale altérée

Les voies de signalisation impliquées au cours de la prévention de néphrotoxicité de la ciclosporine par l'inactivation du RM sont celles de la signalisation calcique et de la vasomotricité.

L'éplérénone peut être utilisée chez le patient transplanté rénal traité par la ciclosporine, même s'il présente une fonction rénale altérée (jusqu'à 30mL/min/1,73m²) : en-dessous d'une kaliémie de 4,35mmol/L, le risque est faible de développer une hyperkaliémie ; au-dessus de ce seuil, il est nécessaire de surveiller de façon plus rapprochée la kaliémie.

Au total, l'ensemble de ces résultats apporte un rationnel fort pour mettre en œuvre une étude prospective visant à tester l'antagonisme pharmacologique du RM afin de préserver la fonction rénale chez les patients transplantés traités par ciclosporine.

Bibliographie

1. Neovius M, Jacobson SH, Eriksson JK, Elinder CG, Hylander B. Mortality in chronic kidney disease and renal replacement therapy: a population-based cohort study. *BMJ Open*. 2014; 4(2):e004251
2. Lloveras J, Arcos E, Comas J, Crespo M, Pascual J. A Paired Survival Analysis Comparing Hemodialysis and Kidney Transplantation From Deceased Elderly Donors Older Than 65 Years. *Transplantation*. 2014;
3. Legendre C, Canaud G, Martinez F. Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014; 27(1):19
4. Nankivell BJ, Chapman JR. Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions. *Transplantation*. 2006; 81(5):643
5. Couchoud C, Lassale M, Stengel B, Jacquelinet C. Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie - Rapport Annuel 2011. 2011.
6. Clayton P, Lim W, Hurst K. ANZDATA Registry transplantation report 2013. <http://www.anzdata.org.au/v1/index.html>: Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry; 2013.
7. Calne RY, White DJ, Thiru S, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*. 1978; 2(8104-5):1323
8. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004; 351(26):2715
9. Italia JL, Bhardwaj V, Kumar MN. Disease, destination, dose and delivery aspects of ciclosporin: the state of the art. *Drug Discov Today*. 2006; 11(17-18):846
10. Azzi JR, Sayegh MH, Mallat SG. Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without. *J Immunol*. 2013; 191(12):5785
11. USRDS. United States Renal Data System. Annual Report. Chapter 6: Transplantation. . 2013 [2014/1122]; Available from: http://www.usrds.org/2014/view/img_v2_06.html - Figure 6.13.
12. Organization WH. WHO Model Lists of Essential Medicines. [pdf]: WHO; 2013 [updated 2013/10]; Available from: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.
13. Nguyen Dinh Cat A, Jaisser F. Extrarenal effects of aldosterone. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012; 21(2):147
14. Nguyen Dinh Cat A, Griol-Charhbili V, Loufrani L, et al. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J*. 2010; 24(7):2454

15. McCurley A, Pires PW, Bender SB, et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med*. 2012; 18(9):1429
16. McCurley A, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 350(2):256
17. Landry Y. Initiation à la connaissance du médicament.: Dunod; 2012.
18. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med*. 1989; 321(25):1725
19. Christians U, Sewing KF. Cyclosporin metabolism in transplant patients. *Pharmacol Ther*. 1993; 57(2-3):291
20. Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther*. 2006; 112(1):184
21. Pallet N, Legendre C. Deciphering calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a pharmacological approach. *Pharmacogenomics*. 2010; 11(10):1491
22. Belitsky P, Levy GA, Johnston A. Neoral absorption profiling: an evolution in effectiveness. *Transplant Proc*. 2000; 32(3A Suppl):45S
23. Mahalati K, Belitsky P, Sketris I, West K, Panek R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation*. 1999; 68(1):55
24. Nashan B, Bock A, Bosmans JL, et al. Use of Neoral C monitoring: a European consensus. *Transpl Int*. 2005; 18(7):768
25. Cantarovitch M, Barkun JS, Tchervenkov JI, Besner JG, Aspeslet L, Metrakos P. Comparison of neoral dose monitoring with cyclosporine through levels versus 2-hr postdose levels in stable liver transplant patients. *Transplantation*. 1998; 66(12):1621
26. Stepkowski SM. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med*. 2000; 2(4):1
27. Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis*. 1996; 28(2):159
28. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*. 2000; 47(2-3):119
29. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)*. 1987; 40(9):1249
30. Huai Q, Kim HY, Liu Y, et al. Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(19):12037

31. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc.* 2004; 36(2 Suppl):25S
32. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* 1976; 6(4):468
33. Showstack J, Katz P, Amend W, et al. The effect of cyclosporine on the use of hospital resources for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 1989; 321(16):1086
34. Barnhart GR, Goldman MH, Hastillo A, et al. Comparison of immunosuppression therapy following heart transplantation: pretransfusion/azathioprine/ATG/prednisone versus cyclosporine/prednisone. *J Heart Transplant.* 1985; 4(4):381
35. Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med.* 1981; 305(5):266
36. Reitz BA, Wallwork JL, Hunt SA, et al. Heart-lung transplantation: successful therapy for patients with pulmonary vascular disease. *N Engl J Med.* 1982; 306(10):557
37. Group TTLT. Experience with single-lung transplantation for pulmonary fibrosis. . *JAMA.* 1988; 259(15):2258
38. Tejani A, Butt KM, Khawar MR, et al. Cyclosporine experience in renal transplantation in children. *Kidney Int Suppl.* 1986; 19:S38
39. Gartner JC, Jr., Zitelli BJ, Malatack JJ, Shaw BW, Iwatsuki S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation in children: two-year experience with 47 patients. *Pediatrics.* 1984; 74(1):140
40. Fricker FJ, Griffith BP, Hardesty RL, et al. Experience with heart transplantation in children. *Pediatrics.* 1987; 79(1):138
41. Gratwohl A, Speck B, Wenk M, et al. Cyclosporine in human bone marrow transplantation. Serum concentration, graft-versus-host disease, and nephrotoxicity. *Transplantation.* 1983; 36(1):40
42. Von Fliedner VE, Jeannet M, Gratwohl A, et al. Immunologic reactivity in marrow graft recipients receiving cyclosporine to prevent graft-versus-host disease. *Transplantation.* 1983; 36(2):125
43. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan E, Seelis RE, Rabinovitch A, Rajotte RV. Normoglycaemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1991; 34(1):55
44. Black KS, Hewitt CW, Chau CL, Pizzo L. Transdermal application of cyclosporine prolongs skin allograft survival. *Transplant Proc.* 1988; 20(2 Suppl 2):660
45. Ziaei M, Manzouri B. Topical Cyclosporine in Corneal Transplantation. *Cornea.* 2014;
46. Niaudet P, Fuchshuber A, Gagnadoux MF, Habib R, Broyer M. Cyclosporine in the therapy of steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int Suppl.* 1997; 58:S85

47. Sethna CB, Gipson DS. Treatment of FSGS in Children. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014; 21(2):194
48. Larson T, Nussenblatt RB, Sen HN. Emerging drugs for uveitis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2011; 16(2):309
49. Rosmarin DM, Lebwohl M, Elewski BE, Gottlieb AB. Cyclosporine and psoriasis: 2008 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 62(5):838
50. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, et al. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*. 1999; 397(6719):530
51. Rezzani R. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog Histochem Cytochem*. 2004; 39(2):85
52. Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. *Lancet*. 2002; 359(9308):741
53. Paus R, Bottge JA, Henz BM, Maurer M. Hair growth control by immunosuppression. *Arch Dermatol Res*. 1996; 288(7):408
54. Kobashigawa JA, Kasiske BL. Hyperlipidemia in solid organ transplantation. *Transplantation*. 1997; 63(3):331
55. Heisel O, Heisel R, Balshaw R, Keown P. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant*. 2004; 4(4):583
56. Marchetti P, Navalesi R. The metabolic effects of cyclosporin and tacrolimus. *J Endocrinol Invest*. 2000; 23(7):482
57. Ho YC, Lin HJ, Tsai CH, Chang YC. Regulation of type I plasminogen activator inhibitor in human gingival fibroblasts with cyclosporine A. *Oral Dis*. 2010; 16(4):396
58. Afonso M, Perrotti V, Rapani M, et al. Immunoexpression of angiogenesis and proliferation markers in patients treated with cyclosporin A. *Minerva Stomatol*. 2014; 63(3):59
59. Arnold R, Pussell BA, Pianta TJ, Lin CS, Kiernan MC, Krishnan AV. Association between calcineurin inhibitor treatment and peripheral nerve dysfunction in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2013; 13(9):2426
60. Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int*. 2000; 13(5):313
61. Gijtenbeek JM, van den Bent MJ, Vecht CJ. Cyclosporine neurotoxicity: a review. *J Neurol*. 1999; 246(5):339
62. Robert N, Wong GW, Wright JM. Effect of cyclosporine on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; (1):CD007893

63. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Zietse R, Unwin RJ, Ellison DH. Pathogenesis of calcineurin inhibitor-induced hypertension. *J Nephrol.* 2012; 25(3):269
64. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4(2):481
65. Liptak P, Ivanyi B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006; 2(7):398
66. Bennett WM, Houghton DC, Buss WC. Cyclosporine-induced renal dysfunction: correlations between cellular events and whole kidney function. *J Am Soc Nephrol.* 1991; 1(11):1212
67. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003; 349(24):2326
68. Lassila M. Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab.* 2002; 3(1):61
69. Curtis JJ, Luke RG, Jones P, Diethelm AG. Hypertension in cyclosporine-treated renal transplant recipients is sodium dependent. *Am J Med.* 1988; 85(2):134
70. Hocherl K, Kees F, Kramer BK, Kurtz A. Cyclosporine A attenuates the natriuretic action of loop diuretics by inhibition of renal COX-2 expression. *Kidney Int.* 2004; 65(6):2071
71. Melnikov S, Mayan H, Uchida S, Holtzman EJ, Farfel Z. Cyclosporine metabolic side effects: association with the WNK4 system. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41(10):1113
72. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med.* 2011; 17(10):1304
73. Stahl RA, Kanz L, Maier B, Schollmeyer P. Hyperchloremic metabolic acidosis with high serum potassium in renal transplant recipients: a cyclosporine A associated side effect. *Clin Nephrol.* 1986; 25(5):245
74. Heering P, Grabensee B. Influence of ciclosporin A on renal tubular function after kidney transplantation. *Nephron.* 1991; 59(1):66
75. Tumlin JA, Sands JM. Nephron segment-specific inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase activity by cyclosporin A. *Kidney Int.* 1993; 43(1):246
76. Batlle DC, Gutterman C, Tarka J, Prasad R. Effect of short-term cyclosporine A administration on urinary acidification. *Clin Nephrol.* 1986; 25 Suppl 1:S62
77. Watanabe S, Tsuruoka S, Vijayakumar S, et al. Cyclosporin A produces distal renal tubular acidosis by blocking peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288(1):F40

78. Zhang Y, Lin DH, Wang ZJ, Jin Y, Yang B, Wang WH. K restriction inhibits protein phosphatase 2B (PP2B) and suppression of PP2B decreases ROMK channel activity in the CCD. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008; 294(3):C765
79. Bantle JP, Nath KA, Sutherland DE, Najarian JS, Ferris TF. Effects of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system and potassium excretion in renal transplant recipients. *Arch Intern Med*. 1985; 145(3):505
80. Lin HY, Rocher LL, McQuillan MA, Schmaltz S, Palella TD, Fox IH. Cyclosporine-induced hyperuricemia and gout. *N Engl J Med*. 1989; 321(5):287
81. Clive DM. Renal transplant-associated hyperuricemia and gout. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11(5):974
82. Holzmacher R, Kendzierski C, Michael Hofman R, Jaffery J, Becker B, Djamali A. Low serum magnesium is associated with decreased graft survival in patients with chronic cyclosporin nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20(7):1456
83. Chang CT, Hung CC, Tian YC, Yang CW, Wu MS. Cyclosporin reduces paracellin-1 expression and magnesium transport in thick ascending limb cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22(4):1033
84. Ledeganck KJ, Boulet GA, Horvath CA, et al. Expression of renal distal tubule transporters TRPM6 and NCC in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity and effect of EGF treatment. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301(3):F486
85. Ledeganck KJ, De Winter BY, Van den Driessche A, et al. Magnesium loss in cyclosporine-treated patients is related to renal epidermal growth factor downregulation. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29(5):1097
86. McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20(10):2215
87. Pallet N, Bouvier N, Legendre C, et al. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy*. 2008; 4(6):783
88. Pallet N, Fougeray S, Beaune P, Legendre C, Thervet E, Anglicheau D. Endoplasmic reticulum stress: an unrecognized actor in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2009; 88(5):605
89. Pallet N, Bouvier N, Bendjallab A, et al. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am J Transplant*. 2008; 8(11):2283
90. Galichon P, Vittoz N, Xu-Dubois YC, et al. Epithelial phenotypic changes detect cyclosporine in vivo nephrotoxicity at a reversible stage. *Transplantation*. 2011; 92(9):993

91. Pichler RH, Franceschini N, Young BA, et al. Pathogenesis of cyclosporine nephropathy: roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol*. 1995; 6(4):1186
92. Hazzan M, Hertig A, Buob D, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts cyclosporine nephrotoxicity in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(7):1375
93. Bedi S, Vidyasagar A, Djamali A. Epithelial-to-mesenchymal transition and chronic allograft tubulointerstitial fibrosis. *Transplant Rev (Orlando)*. 2008; 22(1):1
94. Dieperink H, Starklint H, Leyssac PP, Kemp E. Glomerulotubular function in cyclosporine-treated rats. A lithium clearance, occlusion time/transit time and micropuncture study. *Proc Eur Dial Transplant Assoc Eur Ren Assoc*. 1985; 21:853
95. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*. 1987; 32(1):19
96. English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation*. 1987; 44(1):135
97. Myers BD, Ross J, Newton L, Luetscher J, Perlroth M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med*. 1984; 311(11):699
98. Lo Russo A, Passaquin AC, Andre P, Skutella M, Ruegg UT. Effect of cyclosporin A and analogues on cytosolic calcium and vasoconstriction: possible lack of relationship to immunosuppressive activity. *Br J Pharmacol*. 1996; 118(4):885
99. Auch-Schwelk W, Duske E, Hink U, Betz M, Unkelbach M, Fleck E. Vasomotor responses in cyclosporin A-treated rats after chronic angiotensin blockade. *Hypertension*. 1994; 23(6 Pt 2):832
100. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293(1):F2
101. Ramirez C, Olmo A, O'Valle F, et al. Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol*. 2000; 8(3):161
102. Nakahama H. Stimulatory effect of cyclosporine A on endothelin secretion by a cultured renal epithelial cell line, LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol*. 1990; 180(1):191
103. Perico N, Dadan J, Remuzzi G. Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J Am Soc Nephrol*. 1990; 1(1):76
104. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL. Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int*. 1990; 37(6):1487
105. Lanese DM, Conger JD. Effects of endothelin receptor antagonist on cyclosporine-induced vasoconstriction in isolated rat renal arterioles. *J Clin Invest*. 1993; 91(5):2144

106. Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, et al. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(7):1359
107. Siedlecki A, Anderson JR, Jin X, Garbow JR, Lupu TS, Muslin AJ. RGS4 controls renal blood flow and inhibits cyclosporine-mediated nephrotoxicity. *Am J Transplant*. 2010; 10(2):231
108. Navarro-Antolin J, Lopez-Munoz MJ, Klatt P, Soria J, Michel T, Lamas S. Formation of peroxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *FASEB J*. 2001; 15(7):1291
109. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension*. 1994; 23(6 Pt 2):957
110. Zhong Z, Arteel GE, Connor HD, et al. Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *Am J Physiol*. 1998; 275(4 Pt 2):F595
111. Kou R, Greif D, Michel T. Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem*. 2002; 277(33):29669
112. Hu SJ, Fernandez R, Jones JW, Jr. Cyclosporine A stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells and enhances monocyte adhesion to vascular smooth muscle cells. *Transplant Proc*. 1999; 31(1-2):663
113. Gallego MJ, Zoja C, Morigi M, et al. Cyclosporine enhances leukocyte adhesion to vascular endothelium under physiologic flow conditions. *Am J Kidney Dis*. 1996; 28(1):23
114. Dusting GJ, Akita K, Hickey H, Smith M, Gurevich V. Cyclosporin A and tacrolimus (FK506) suppress expression of inducible nitric oxide synthase in vitro by different mechanisms. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(2):337
115. Erxleben C, Liao Y, Gentile S, et al. Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of CaV1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(10):3932
116. Schuhmann K, Romanin C, Baumgartner W, Groschner K. Intracellular Ca²⁺ inhibits smooth muscle L-type Ca²⁺ channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel. *J Gen Physiol*. 1997; 110(5):503
117. Lo Russo A, Passaquin AC, Ruegg UT. Mechanism of enhanced vasoconstrictor hormone action in vascular smooth muscle cells by cyclosporin A. *Br J Pharmacol*. 1997; 121(2):248
118. Moss NG, Powell SL, Falk RJ. Intravenous cyclosporine activates afferent and efferent renal nerves and causes sodium retention in innervated kidneys in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(23):8222
119. Zhang W, Victor RG. Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2000; 13(9):999

120. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int.* 1985; 28(5):767
121. Elzinga LW, Rosen S, Burdmann EA, Hatton DC, Lindsley J, Bennett WM. The role of renal sympathetic nerves in experimental chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation.* 2000; 69(10):2149
122. Hausberg M, Lang D, Levers A, et al. Sympathetic nerve activity in renal transplant patients before and after withdrawal of cyclosporine. *J Hypertens.* 2006; 24(5):957
123. Bonvalet JP. Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney International.* 1998; 65:S49
124. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal.* 2007; 5:e012
125. Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001; 280(2):F181
126. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science.* 1988; 242(4878):583
127. Bocchi B, Fagart J, Cluzeaud F, Fay M, Rafestin-Oblin ME, Farman N. Glucocorticoid metabolism by 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 modulates human mineralocorticoid receptor transactivation activity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 84(2-3):239
128. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, et al. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med.* 2008; 14(12):1370
129. Shibata S, Mu S, Kawarazaki H, et al. Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J Clin Invest.* 2011; 121(8):3233
130. Bertocchio JP, Jaisser F. [Aldosterone and kidney diseases: an emergent paradigm with important clinical implications]. *Nephrol Ther.* 2011; 7(3):139
131. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* 1987; 237(4812):268
132. Heering PJ, Kurschat C, Vo DT, Klein-Vehne N, Fehsel K, Ivens K. Aldosterone resistance in kidney transplantation is in part induced by a down-regulation of mineralocorticoid receptor expression. *Clin Transplant.* 2004; 18(2):186
133. de Resende MM, Kauser K, Mill JG. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci.* 2006; 78(26):3066

134. DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Enhancement of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor density in the microcirculation of the spontaneously hypertensive rat. *Microcirculation*. 2004; 11(1):69
135. Struthers AD, MacDonald TM. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc Res*. 2004; 61(4):663
136. Lang CC, Struthers AD. Targeting the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2013; 10(3):125
137. Kolkhof P, Borden SA. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 350(2):310
138. Barr CS, Lang CC, Hanson J, Arnott M, Kennedy N, Struthers AD. Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1995; 76(17):1259
139. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999; 341(10):709
140. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003; 348(14):1309
141. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011; 364(1):11
142. Matsumoto Y, Mori Y, Kageyama S, et al. Spironolactone reduces cardiovascular and cerebrovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(6):528
143. Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, et al. Long-term effects of spironolactone in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25(5):1094
144. Viazzi F, Leoncini G, Pontremoli R. Antihypertensive treatment and renal protection: the role of drugs inhibiting the renin-angiotensin-aldosterone system. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2013; 20(4):273
145. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1993; 329(20):1456
146. Nefrologia) TGGGIIdSEi. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). *Lancet*. 1997; 349(9069):1857

147. Maschio G, Alberti D, Janin G, et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med*. 1996; 334(15):939
148. Wheeler DC, Becker GJ. Summary of KDIGO guideline. What do we really know about management of blood pressure in patients with chronic kidney disease? *Kidney Int*. 2013; 83(3):377
149. Moranne O, Bakris G, Fafin C, Favre G, Pradier C, Esnault VL. Determinants and changes associated with aldosterone breakthrough after angiotensin II receptor blockade in patients with type 2 diabetes with overt nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013; 8(10):1694
150. Struthers AD. Aldosterone escape during ACE inhibitor therapy in chronic heart failure. *Eur Heart J*. 1995; 16 Suppl N:103
151. Nishiyama A, Yao L, Fan Y, et al. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension*. 2005; 45(4):710
152. Lee SH, Yoo TH, Nam BY, et al. Activation of local aldosterone system within podocytes is involved in apoptosis under diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297(5):F1381
153. Bertocchio JP, Warnock DG, Jaisser F. Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011; 79(10):1051
154. Rossignol P, Menard J, Fay R, Gustafsson F, Pitt B, Zannad F. Eplerenone survival benefits in heart failure patients post-myocardial infarction are independent from its diuretic and potassium-sparing effects. Insights from an EPHEsus (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study) substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58(19):1958
155. McGraw AP, McCurley A, Preston IR, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in vascular disease: connecting molecular pathways to clinical implications. *Curr Atheroscler Rep*. 2013; 15(7):340
156. Struthers AD. Aldosterone-induced vasculopathy. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 217(1-2):239
157. Weber KT. The neuroendocrine-immune interface gone awry in aldosteronism. *Cardiovasc Res*. 2004; 64(3):381
158. Oberleithner H, Ludwig T, Riethmuller C, et al. Human endothelium: target for aldosterone. *Hypertension*. 2004; 43(5):952
159. Kornel L. Colocalization of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and mineralocorticoid receptors in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens*. 1994; 7(1):100
160. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, et al. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness. *Hypertension*. 2014; 63(3):520
161. Caprio M, Newfell BG, la Sala A, et al. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ Res*. 2008; 102(11):1359

162. Christy C, Hadoke PW, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR, Walker BR. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mouse aorta: localization and influence on response to glucocorticoids. *Hypertension*. 2003; 42(4):580
163. Callera GE, Yogi A, Briones AM, et al. Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: role of PDGFR. *Cardiovasc Res*. 2011; 91(4):720
164. Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirano Y, Hirata Y. Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology*. 2008; 149(3):1009
165. Schiffrin EL, Franks DJ, Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985; 63(12):1522
166. Batenburg WW, Jansen PM, van den Bogaardt AJ, AH JD. Angiotensin II-aldosterone interaction in human coronary microarteries involves GPR30, EGFR, and endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res*. 2012; 94(1):136
167. Stow LR, Gumz ML, Lynch IJ, et al. Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). *J Biol Chem*. 2009; 284(44):30087
168. Blanco-Rivero J, Cachafeiro V, Lahera V, et al. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 2005; 46(1):107
169. Oberleithner H, Riethmuller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(41):16281
170. Leopold JA, Dam A, Maron BA, et al. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med*. 2007; 13(2):189
171. Griol-Charhbili V, Fassot C, Messaoudi S, Perret C, Agrapart V, Jaisser F. Epidermal growth factor receptor mediates the vascular dysfunction but not the remodeling induced by aldosterone/salt. *Hypertension*. 2011; 57(2):238
172. Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res*. 2013; 50(2):89
173. Lee DB. Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int*. 1997; 52(1):248
174. Kurtz A, Della Bruna R, Kuhn K. Cyclosporine A enhances renin secretion and production in isolated juxtaglomerular cells. *Kidney Int*. 1988; 33(5):947
175. Nitta K, Friedman AL, Nicastri AD, Paik S, Friedman EA. Granular juxtaglomerular cell hyperplasia caused by cyclosporine. *Transplantation*. 1987; 44(3):417
176. Tufro-McReddie A, Gomez RA, Norling LL, Omar AA, Moore LC, Kaskel FJ. Effect of CsA on the expression of renin and angiotensin type 1 receptor genes in the rat kidney. *Kidney Int*. 1993; 43(3):615

177. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, et al. Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1995; 48(2):439
178. Helmchen U, Bach D, Rohland C, Groene H. Dissociation of renal renin content (RRC) and plasma renin concentration (PRC) in cyclosporine A (CyA)-treated two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Kidney Int.* 1988; 33(1):267
179. Saraswat MS, Addepalli V, Jain M, Pawar VD, Patel RB. Renoprotective activity of aliskiren, a renin inhibitor in cyclosporine A induced hypertensive nephropathy in dTG mice. *Pharmacol Rep.* 2014; 66(1):62
180. Madsen K, Friis UG, Gooch JL, et al. Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 2010; 77(2):110
181. Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, et al. Treatment with aliskiren ameliorates tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014;
182. Edwards BD, Chalmers RJ, O'Driscoll JB, et al. Angiotensin II as a risk factor for cyclosporin nephrotoxicity in patients with psoriasis. *Clin Nephrol.* 1994; 41(6):350
183. Letizia C, d'Ambrosio C, De Ciocchis A, Scavo D, Pozzilli P. Serum angiotensin-converting enzyme levels in patients with recent-onset insulin-dependent diabetes after one year of low-dose cyclosporin therapy. IMDIAB Study Group. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1995; 15(5-6):209
184. Iwai J, Kanayama Y, Negoro N, Inoue T, Okamura M, Takeda T. Increased gene expression of angiotensin II type 1A receptor in aortic smooth muscle cells of cyclosporin A-induced hypertensive rats. *J Hypertens Suppl.* 1993; 11(5):S122
185. Avdonin PV, Cottet-Maire F, Afanasjeva GV, Loktionova SA, Lhote P, Ruegg UT. Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 1999; 55(6):2407
186. Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, et al. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289(5):F1020
187. Macunluoglu B, Arikan H, Atakan A, et al. Effects of spironolactone in an experimental model of chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc.* 2008; 40(1):273
188. Feria I, Pichardo I, Juarez P, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int.* 2003; 63(1):43
189. Nielsen FT, Jensen BL, Marcussen N, Skott O, Bie P. Inhibition of mineralocorticoid receptors with eplerenone alleviates short-term cyclosporin A nephrotoxicity in conscious rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23(9):2777

190. Nielsen FT, Jensen BL, Hansen PB, Marcussen N, Bie P. The mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone reduces renal interstitial fibrosis after long-term cyclosporine treatment in rat: antagonizing cyclosporine nephrotoxicity. *BMC Nephrol.* 2013; 14:42
191. Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, et al. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292(1):F131
192. Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, et al. Olmesartan attenuates tacrolimus-induced biochemical and ultrastructural changes in rat kidney tissue. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:607246
193. Hoskova L, Malek I, Kautzner J, et al. Tacrolimus-induced hypertension and nephrotoxicity in Fawn-Hooded rats are attenuated by dual inhibition of renin-angiotensin system. *Hypertens Res.* 2014; 37(8):724
194. Issa N, Kukla A, Ibrahim HN. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am J Nephrol.* 2013; 37(6):602
195. Casey MJ, Meier-Kriesche HU. Calcineurin inhibitors in kidney transplantation: friend or foe? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011; 20(6):610
196. Ekberg H, Grinyo J, Nashan B, et al. Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study. *Am J Transplant.* 2007; 7(3):560
197. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007; 357(25):2562
198. Larson TS, Dean PG, Stegall MD, et al. Complete avoidance of calcineurin inhibitors in renal transplantation: a randomized trial comparing sirolimus and tacrolimus. *Am J Transplant.* 2006; 6(3):514
199. Flechner SM, Glyda M, Cockfield S, et al. The ORION study: comparison of two sirolimus-based regimens versus tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *Am J Transplant.* 2011; 11(8):1633
200. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation.* 2009; 87(2):233
201. Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O, et al. Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: concept study. *Am J Transplant.* 2009; 9(5):1115
202. Weir MR, Mulgaonkar S, Chan L, et al. Mycophenolate mofetil-based immunosuppression with sirolimus in renal transplantation: a randomized, controlled Spare-the-Nephron trial. *Kidney Int.* 2011; 79(8):897

203. Roodnat JI, Hilbrands LB, Hene RJ, et al. 15-year follow-up of a multicenter, randomized, calcineurin inhibitor withdrawal study in kidney transplantation. *Transplantation*. 2014; 98(1):47
204. Srinivas TR, Schold JD, Guerra G, Eagan A, Bucci CM, Meier-Kriesche HU. Mycophenolate mofetil/sirolimus compared to other common immunosuppressive regimens in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2007; 7(3):586
205. Morales JM, Rodriguez-Paternina E, Araque A, et al. Long-term protective effect of a calcium antagonist on renal function in hypertensive renal transplant patients on cyclosporine therapy: a 5-year prospective randomized study. *Transplant Proc*. 1994; 26(5):2598
206. Kuypers DR, Neumayer HH, Fritsche L, Budde K, Rodicio JL, Vanrenterghem Y. Calcium channel blockade and preservation of renal graft function in cyclosporine-treated recipients: a prospective randomized placebo-controlled 2-year study. *Transplantation*. 2004; 78(8):1204
207. Leenen FH, Coletta E, Davies RA. Prevention of renal dysfunction and hypertension by amlodipine after heart transplant. *Am J Cardiol*. 2007; 100(3):531
208. Lindelow B, Bergh CH, Herlitz H, Waagstein F. Predictors and evolution of renal function during 9 years following heart transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11(5):951
209. Cross NB, Webster AC, Masson P, O'Connell P J, Craig JC. Antihypertensives for kidney transplant recipients: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Transplantation*. 2009; 88(1):7
210. Moran M, Mozes MF, Maddux MS, et al. Prevention of acute graft rejection by the prostaglandin E1 analogue misoprostol in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and prednisone. *N Engl J Med*. 1990; 322(17):1183
211. Ray JG. Prostaglandin E1 analogs do not improve renal function among either transplant or nontransplant patients: no further trials required. *Transplantation*. 1998; 66(4):476
212. Zhang XZ, Ardissino G, Ghio L, et al. L-arginine supplementation in young renal allograft recipients with chronic transplant dysfunction. *Clin Nephrol*. 2001; 55(6):453
213. Park JW, Bae EH, Kim IJ, et al. Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats. *Kidney Int*. 2010; 77(12):1076
214. Hannedouche TP, Natov S, Boitard C, Lacour B, Grunfeld JP. Angiotensin converting enzyme inhibition and chronic cyclosporine-induced renal dysfunction in type 1 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11(4):673
215. Campistol JM, Inigo P, Jimenez W, et al. Losartan decreases plasma levels of TGF-beta1 in transplant patients with chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*. 1999; 56(2):714
216. Inigo P, Campistol JM, Lario S, et al. Effects of losartan and amlodipine on intrarenal hemodynamics and TGF-beta(1) plasma levels in a crossover trial in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(4):822

217. Ibrahim HN, Jackson S, Connaire J, et al. Angiotensin II blockade in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24(2):320
218. Issa N, Ortiz F, Reule SA, et al. The renin-aldosterone axis in kidney transplant recipients and its association with allograft function and structure. *Kidney Int*. 2014; 85(2):404
219. Gonzalez Monte E, Andres A, Polanco N, et al. Addition of spironolactone to dual blockade of renin angiotensin system dramatically reduces severe proteinuria in renal transplant patients: an uncontrolled pilot study at 6 months. *Transplant Proc*. 2010; 42(8):2899
220. Yang CW, Faulkner GR, Wahba IM, et al. Expression of apoptosis-related genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity in mice. *Am J Transplant*. 2002; 2(5):391
221. Alvarez Arroyo MV, Suzuki Y, Yague S, et al. Role of endogenous vascular endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporine toxicity. *Transplantation*. 2002; 74(11):1618
222. Kim YO, Lim SW, Li C, et al. Activation of intrarenal complement system in mouse model for chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Yonsei Med J*. 2007; 48(3):517
223. Neria F, Castilla MA, Sanchez RF, et al. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int*. 2009; 75(2):227
224. Pillebout E, Burtin M, Yuan HT, et al. Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction: association with the progression of renal lesions. *Am J Pathol*. 2001; 159(2):547
225. Elzinga LW, Rosen S, Bennett WM. Dissociation of glomerular filtration rate from tubulointerstitial fibrosis in experimental chronic cyclosporine nephropathy: role of sodium intake. *J Am Soc Nephrol*. 1993; 4(2):214
226. Viau A, El Karoui K, Laouari D, et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest*. 2010; 120(11):4065
227. Simon R. Optimal two-stage designs for phase II clinical trials. *Control Clin Trials*. 1989; 10(1):1
228. Butler T, Paul J, Europe-Finner N, Smith R, Chan EC. Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013; 304(6):C485
229. Wilson AJ, Jabr RI, Clapp LH. Calcium modulation of vascular smooth muscle ATP-sensitive K(+) channels: role of protein phosphatase-2B. *Circ Res*. 2000; 87(11):1019
230. Seiferth A, Ruhs S, Mildenerberger S, Gekle M, Grossmann C. The phosphatase calcineurin PP2BA β mediates part of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *FASEB J*. 2012; 26(6):2327


231. Faresse N. Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 143:334
232. Khanna A. Tacrolimus and cyclosporine in vitro and in vivo induce osteopontin mRNA and protein expression in renal tissues. *Nephron Exp Nephrol*. 2005; 101(4):e119
233. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, et al. The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin. *J Exp Med*. 1992; 176(3):751
234. Mollison KW, Fey TA, Krause RA, et al. Nephrotoxicity studies of the immunosuppressants tacrolimus (FK506) and ascomycin in rat models. *Toxicology*. 1998; 125(2-3):169
235. Ghisdal L, Bouchta NB, Broeders N, et al. Conversion from tacrolimus to cyclosporine A for new-onset diabetes after transplantation: a single-centre experience in renal transplanted patients and review of the literature. *Transpl Int*. 2008; 21(2):146
236. Shihab FS, Waid TH, Conti DJ, et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus in patients at risk for chronic renal allograft failure: 60-month results of the CRAF Study. *Transplantation*. 2008; 85(9):1261
237. Kihm LP, Blume C, Seckinger J, et al. Acute effects of calcineurin inhibitors on kidney allograft microperfusion visualized by contrast-enhanced sonography. *Transplantation*. 2012; 93(11):1125
238. Yasutsune T, Kawakami N, Hirano K, et al. Vasorelaxation and inhibition of the voltage-operated Ca²⁺ channels by FK506 in the porcine coronary artery. *Br J Pharmacol*. 1999; 126(3):717
239. Smyth A, Dunkler D, Gao P, et al. The relationship between estimated sodium and potassium excretion and subsequent renal outcomes. *Kidney Int*. 2014; 86(6):1205
240. RALES. Effectiveness of spironolactone added to an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a loop diuretic for severe chronic congestive heart failure (the Randomized Aldactone Evaluation Study [RALES]). *Am J Cardiol*. 1996; 78(8):902

Annexes

Annexe 1 : Revue « aldostérone et pathologies rénales »

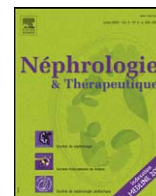
Cette revue publiée dans le journal *Néphrologie & Thérapeutique* en 2011 (130) reprend l'ensemble des données physiopathologiques et cliniques de l'implication de l'aldostérone au cours des pathologies rénales (cf. Le Récepteur Minéralocorticoïde dans les maladies rénales, p. 30).



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

 www.em-consulte.com



Revue générale/Mise au point

Aldostérone et pathologies rénales : une notion émergente avec des implications thérapeutiques importantes

Aldosterone and kidney diseases: An emergent paradigm with important clinical implications

Jean-Philippe Bertocchio, Frédéric Jaisser*

Inserm U872, Team 1, centre de recherche des Cordeliers, 15, rue de l'École de Médecine, 75270 Paris cedex 06, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 28 juin 2010

Accepté le 26 octobre 2010

Mots clés :

Aldostérone

Maladies du rein

Protéinurie

Récepteur minéralocorticoïde

RÉSUMÉ

De nouvelles armes thérapeutiques sont nécessaires pour ralentir la progression des maladies rénales chroniques. Le système rénine-angiotensine-aldostérone semble une cible de choix mais l'aldostérone est un acteur souvent oublié. L'aldostérone a une action sur l'épithélium du néphron distal : elle permet une réabsorption vectorielle de sodium et régule la volémie. Récemment, des cibles cellulaires non classiques ont été identifiées comme le cœur et les vaisseaux mais également des cibles rénales non épithéliales (cellules mésangiales, podocytes, fibroblastes). L'implication de l'aldostérone (et l'activation de son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde) a été décrite dans différentes maladies rénales : les néphropathies diabétique ou hypertensive, l'insuffisance rénale et certaines glomérulopathies. Ces effets semblent indépendants de son action hypertensive, suggérant que le blocage du récepteur minéralocorticoïde exprimé dans ces cibles non classiques peut avoir des applications cliniques importantes. Chez l'homme, des essais cliniques montrent un effet bénéfique des antagonistes du récepteur minéralocorticoïde, tels que la spironolactone ou l'éplérénone, chez des patients, insuffisants rénaux ou non, ainsi que chez les patients en insuffisance rénale terminale. Les effets indésirables rapportés (hyperkaliémie modérée) n'empêchent pas la poursuite du traitement avec une surveillance adaptée. Dans cette revue, nous discutons les avancées récentes de la recherche (à la fois fondamentale et clinique) dans ce domaine.

© 2010 Association Société de néphrologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Slowing the progression of chronic kidney diseases needs new efficient treatments. Aldosterone classically acts on the distal nephron: it allows sodium reabsorption, potassium secretion and participates to blood volume control. Recently, new targets of aldosterone have been described including the heart and the vasculature but also non-epithelial kidney cells such as mesangial cells, podocytes and renal fibroblasts. The pathophysiological implication of aldosterone and its receptor, the mineralocorticoid receptor has been demonstrated *ex vivo* in cell culture and *in vivo* in experimental animal models with kidney damages such as diabetic and hypertensive kidney nephropathies, chronic kidney disease and glomerulopathies. The beneficial effects of the pharmacological antagonists of the mineralocorticoid receptor are independent of the hypertensive effect of aldosterone, indicating that blocking the activation of the mineralocorticoid receptor in these non-classical renal targets may be of clinical importance. Several clinical studies now report benefit and safety when using spironolactone or eplerenone, the currently available mineralocorticoid receptor antagonists, in patients with kidney diseases. In this review, we discuss the recent results reported in experimental and clinical research in this domain.

© 2010 Association Société de néphrologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords:

Aldosterone

Kidney diseases

Proteinuria

Receptors

Mineralocorticoid

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : frederic.jaisser@inserm.fr (F. Jaisser).

1. Abréviations

11 β HSD2	11bêta hydroxysteroid déshydrogénase de type 2
Aldo	aldostérone
ARAI	antagonistes du récepteur de l'angiotensine II
CsA	ciclosporine A
ENaC	canal sodique épithélial
IEC	inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IRC	insuffisance rénale chronique
IRT	insuffisance rénale terminale
RM	récepteur minéralocorticoïde
SRAA	système rénine-angiotensine-aldostérone

2. Introduction

En 1955, Conn publie le premier cas d'hyperaldostéronisme primaire chez une jeune femme [1]. Elle présente aussi une protéinurie. Dans les années 1960, il publie une série de 145 cas présentant un hyperaldostéronisme primaire prouvé [2] : on retrouve une protéinurie dans 85 % des cas. Cette protéinurie a longtemps été mise sur le compte de l'hypertension qui accompagne le syndrome de Conn, jusque dans les années 1990 où des modèles animaux ont montré l'implication des hormones minéralocorticoïdes, en particulier de l'aldo, dans l'apparition d'une protéinurie, notamment chez le rat [3], sans qu'elle ne soit corrélée à l'apparition d'une hypertension artérielle. Il faut attendre 2001 pour voir apparaître les premiers cas d'utilisation d'antagonistes du récepteur de l'aldo, le RM, chez l'homme en dehors du syndrome de Conn [4]. Dans cette publication sous forme de lettre à propos de huit patients protéinuriques, Chrysostomou et Becker sont les premiers à montrer une diminution de la protéinurie (de l'ordre de 50 %)

après administration de spironolactone [4]. Par la suite, de nombreuses études cliniques et fondamentales ont montré l'implication de l'aldo et de son récepteur dans l'apparition d'une protéinurie et, par-là, de la progression de l'IRC.

L'objectif de cette revue est de faire le point sur l'implication de l'aldo et de son récepteur, le RM, en pathologie rénale.

3. Nouveaux concepts sur le rôle physiopathologique de l'aldostérone

L'aldo participe au contrôle de la réabsorption de sodium et la sécrétion de potassium dans le tubule distal et le canal collecteur rénal. Ce travail a bénéficié du soutien de l'Inserm, l'Agence nationale pour la recherche (ANR-09-BLAN-0156-01), la Fondation Leducq et du centre de recherche industrielle et technique. L'aldo joue ainsi un rôle majeur dans la régulation de la volémie et de la pression artérielle [5]. L'hormone exerce ses effets dans le néphron distal en se liant au RM. Le RM est un récepteur qui est un facteur de transcription ligand-dépendant se liant sur des éléments de réponse spécifiques des glucocorticoïdes (Fig. 1) [5]. Les cibles moléculaires dont l'expression est modulée dans le tubule rénal par l'aldo sont nombreuses (Fig. 1). Elles concourent à moduler la réabsorption transépithéliale de sodium, par l'augmentation de l'expression du ENaC apical et de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase basolatérale [6,7]. L'expression membranaire de ENaC est également étroitement contrôlée par l'aldo, via la régulation de l'expression/activité d'enzymes d'ubiquitinylation comme Usp2-45 [8]. Le RM peut lier de façon aussi efficace l'aldo ou les glucocorticoïdes comme le cortisol (la corticostérone chez les rongeurs). La spécificité de l'action de l'aldo dans le néphron distal est assurée par l'expression et l'activité de l'enzyme 11 β HSD2 (Fig. 1). La 11 β HSD2 convertit le cortisol en cortisone (ayant une faible affinité pour le RM), empêchant ainsi l'occupation du RM par le cortisol en lieu et place de l'aldo, pourtant présente à des

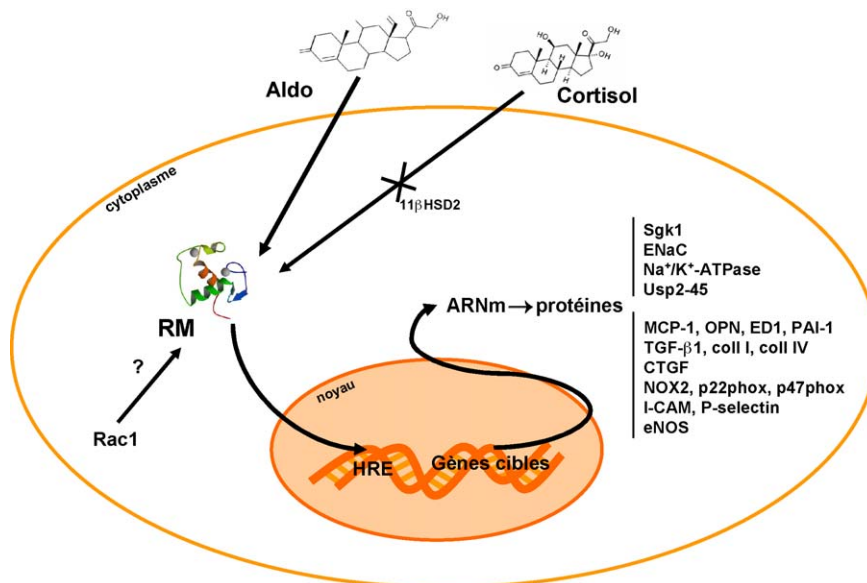


Fig. 1. Fonctions cellulaires du RM.

L'aldo peut activer le RM cytoplasmique qui se fixe dans le noyau à des régions spécifiques appelées en anglais *hormone response elements* et induit ainsi la transcription de ses gènes cibles. Le cortisol peut aussi activer le RM mais est inactivé par l'enzyme 11 β HSD2. La protéine Rac1 a récemment été proposée comme activatrice du RM. Aldo : aldostérone ; RM : récepteur minéralocorticoïde ; HRE : *hormone response element* ; 11 β HSD2 : 11-bêta-hydroxysteroid-déshydrogénase de type 2 ; Rac1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* ; Sgk1 : *Serine/threonine-protein kinase 1* ; ENaC : canal sodique épithélial ; Na⁺/K⁺-ATPase : pompe échangeuse sodium/potassium ATP-dépendante ; Usp2-45 : *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2-45* ; ARNm : acide ribonucléique messager ; MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1* ; OPN : ostéopontine ; ED1 = ectodysplasine A ; PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ; TGF- β 1 : *transforming growth factor β 1* ; coll I : collagène I ; coll IV : collagène IV ; CTGF : *connective tissue growth factor* ; NOX2 : NADPH oxydase de type 2 ; p22phox : sous-unité p22 de la NADPH oxydase ; p47phox : sous-unité p47 de la NADPH oxydase ; I-CAM : *intercellular adhesion molecule* ; P-selectin : sélectine P ; eNOS : NO synthase endothéliale.

concentrations 100 à 1000 fois inférieures à celles du cortisol [9]. D'autres mécanismes pré- et post-récepteur peuvent aussi être importants (modifications post-traductionnelles du RM, cinétique d'association/dissociation des ligands, compartimentalisation cellulaire par exemple) [8].

Le clonage moléculaire du RM par Arriza et al. en 1987 [10] a permis de cartographier l'expression tissulaire du RM. Le RM est exprimé dans le tubule distal (tube contourné distal et collecteur), le côlon distal et les glandes sudorales, sites préalablement reconnus comme sites d'action classique de l'aldo [9]. Toutefois, le RM est également exprimé dans des tissus et types cellulaires ne transportant pas le sodium de façon vectorielle et ne participant pas à l'homéostasie hydrosodée, suggérant un rôle nouveau et jusqu'alors inconnu de l'aldo et de l'activation du RM dans ces cibles. Dans certaines de ces cibles non classiques (comme l'endothélium), le RM est co-exprimé avec la 11 β HSD2 indiquant que l'aldo est bien le ligand préférentiel du RM dans ces cellules [11]. Dans d'autres cibles au contraire (cardiomyocytes, cellules musculaires lisses vasculaires, neurones, adipocytes, kératino-cytes), l'absence d'expression de la 11 β HSD2 suggère que le ligand du RM est alors le cortisol (ou la corticostérone) et non l'aldo [11,12].

L'aldo est avant tout une hormone physiologique permettant de maintenir un volume extracellulaire et circulant adapté en cas de déplétion volémique aiguë ou de déplétion sodée [9]. Toutefois cette hormone devient pathologique dans certaines conditions dans lesquelles l'activation du RM n'est plus adaptée à la situation [13]. Dans ce cas, l'activation prolongée du récepteur par son propre ligand, l'aldo, ou par les glucocorticoïdes, induit des conséquences pathologiques comme l'hypertension [3], le remodelage de la matrice extracellulaire [3], l'apoptose ou l'inflammation [14]. Le modèle de « co-incidence » propose que l'addition de deux ou plusieurs cofacteurs ait un effet synergique sur l'activation inappropriée du RM dans différents contextes cellulaires [13]. Parmi ces déclencheurs se trouvent : le sel qui pourrait modifier les réponses cellulaires (volume cellulaire, rigidité membranaire, inflammation), le stress oxydatif (induit par l'angiotensine par exemple ou d'autres hormones) et l'activation ligand-indépendante du RM. Ainsi une élévation modeste, mais concomitante, de l'aldo ou de l'expression du RM, du stress oxydatif (quelle qu'en soit l'origine) et de la charge sodée pourrait conduire à des anomalies moléculaires et fonctionnelles conduisant in fine à des désordres physiopathologiques importants.

La mise en évidence de l'expression du RM dans le cœur et les vaisseaux a soulevé la question de son rôle physiopathologique dans ces cibles non classiques. Le modèle pharmacologique associant unéphrectomie et administration chronique d'aldo en présence d'un apport sodé élevé conduit à une augmentation de la pression artérielle et des conséquences tissulaires majeures avec un remodelage de la matrice extracellulaire périvasculaire et tissulaire (rénale et cardiaque) [15,16]. L'administration de doses non hypotensives d'antagonistes du RM, tels que la spironolactone ou l'éplérénone, a clairement permis de dissocier les conséquences hémodynamiques de son rôle pro-fibrosant, pro-inflammatoire et générateur de stress oxydatif [17].

L'expression du RM peut être modulée dans certains contextes pathologiques comme le diabète [18–20], l'insuffisance rénale [21], l'insuffisance cardiaque [22,23], l'infarctus du myocarde [24,25], l'hypertension artérielle [26], le vieillissement vasculaire [27] ou l'anévrisme cérébral [28] par exemple. Plus récemment, il a été proposé que l'activation du RM puisse même être indépendante du ligand. L'activation du RM par la protéine Rac1 a été démontrée dans l'endothélium et le podocyte [29,30]. Des modifications post-traductionnelles par phosphorylation, comme cela a été démontré pour le récepteur

glucocorticoïde ou celui des estrogènes par exemple sont également possibles [31]. Ces résultats indiquent que l'activation du RM ne nécessite pas obligatoirement une augmentation du taux circulant de l'aldo, expliquant probablement pourquoi l'antagonisme pharmacologique du RM est bénéfique dans diverses situations pathologiques où l'aldostéronémie est pourtant normale.

4. Minéralocorticoïdes et pathologies rénales : preuves expérimentales

4.1. Expression du RM dans le rein

L'expression du RM a été d'abord mise en évidence dans le néphron distal, allant du tube contourné distal au canal collecteur médullaire interne [9]. L'immunolocalisation du RM a longtemps été délicate. La génération d'anticorps monoclonaux dirigés contre le RM par Gomez-Sanchez et al. a permis un progrès considérable dans l'immunodétection du RM dans des tissus où le niveau d'expression est plus faible que dans le tube contourné distal [32]. Le RM est clairement exprimé dans les cellules endothéliales des artères interlobaires rénales chez la souris, et plus faiblement dans les cellules musculaires lisses [11]. En condition physiologique, l'expression du RM n'est pas détectable dans les glomérules mais elle a été montrée ex vivo dans des cultures cellulaires de podocytes [30], de cellules mésangiales [33] et de fibroblastes rénaux [34]. In vivo, il est possible que l'expression du RM ne soit induite dans des sites non classiques comme les podocytes ou les cellules mésangiales qu'en situation pathologique. Cela a été démontré en cas de diabète de type I induit chez le rat [35] et dans le modèle de rat spontanément hypertendu avec syndrome métabolique SHR/cp [36], situations dans lesquelles l'expression du RM est clairement stimulée dans les podocytes in vivo.

4.2. Conséquences physiopathologiques rénales de l'activation du RM in vivo

Les conséquences physiopathologiques de l'activation du RM dans le rein peuvent être déduites d'expériences menées avec injection d'aldo (ou au contraire suppression de la production d'aldo après surrénalectomie) ou bien par antagonisme pharmacologique du RM.

4.2.1. Néphropathie hypertensive

Le blocage pharmacologique du RM prévient/tempère la néphroangiosclérose induite par le blocage de la synthèse de NO (l-NAME et charge sodée) [37,38], par la charge sodée dans le modèle de rat Dahl sensible au sel [39] ainsi que chez le rat spontanément hypertendu SHR-SP [40] et le rat transgénique ren2 [41]. Ces effets bénéfiques sont observés en absence de baisse de la pression artérielle, indiquant un mécanisme protecteur non hémodynamique. Les mécanismes impliqués sont la baisse du stress oxydatif, de l'inflammation, du remodelage matriciel et des altérations de la barrière de filtration. L'aldo module l'expression de molécules pro-inflammatoires comme MCP-1 [42], pro-fibrosantes telles que PAI-1, TGF- β , CTGF par exemple [40,42] ainsi que certains composants de la NADPH oxydase (NOX2, p22phox et p47phox) [42]. Les podocytes sont directement affectés et une baisse de l'expression de podocine, synaptopodine et néphrine est observée ainsi qu'une apoptose importante [42]. Après activation du RM, les vaisseaux intrarénaux présentent des lésions d'angiosclérose et microthrombopathie [37,43]. L'endothélium semble directement affecté, avec une modulation de l'expression de différentes molécules d'adhésion comme I-CAM et P-selectin ainsi qu'une réduction de l'expression de la NO synthase endothéliale [39]. L'éplérénone prévient l'activation

de Rac1 par l'aldo dans l'endothélium [29]. Ces différents effets pourraient participer aux actions bénéfiques des antagonistes du RM dans les pathologies rénales.

4.2.2. Insuffisance rénale chronique

L'implication du couple aldo/RM a été mise en évidence dans plusieurs modèles d'IRC. La baisse de la filtration glomérulaire, la glomérulosclérose et la protéinurie associées à la réduction néphronique subtotale sont augmentées après perfusion d'aldo [3] et diminuées en absence d'aldo circulante (après surrenalectomie) [44] ou après traitement par la spironolactone [45]. L'antagonisme du RM permet d'ailleurs de ralentir la progression de lésions déjà existantes en absence de modification de la pression artérielle [45]. Un effet bénéfique des antagonistes du RM a également été observé : dans un modèle de glomérulonéphrite proliférative (anticorps anti-thy 1.1) dans lequel la spironolactone prévient la prolifération et la fibrose interstitielle [46] ; dans un modèle de syndrome néphrotique expérimental (adriamycine) dans lequel l'éplérénone prévient la protéinurie [47] ; ainsi que dans un modèle de néphropathie lupique (souris NZB/W F₁) dans lequel la spironolactone diminue la protéinurie et les lésions glomérulaires (à pression artérielle constante) ainsi que l'inflammation et l'apoptose [48].

Un des mécanismes impliqués pourrait être l'activation de la voie Rho kinase et des protéines Rac1 [30,39,41,49]. Dans un modèle transgénique avec activation constitutive de la voie Rac1/Rho kinase présentant un syndrome néphrotique avec protéinurie massive, le blocage du RM par un antagoniste spécifique (l'éplérénone) prévient totalement la protéinurie en absence de baisse de la pression artérielle [30]. Le RM pourrait être une cible directe de Rac1, contrôlant ainsi son activation dans le podocyte, même en absence d'augmentation de son ligand [30].

4.2.3. Néphropathie diabétique

L'implication de l'aldo et/ou de l'activation du RM dans la néphropathie diabétique a été largement démontrée dans des modèles expérimentaux. L'expression rénale du RM est augmentée chez les animaux présentant un diabète de type I (induit par la streptozotocine) [18,20,35] ou de type II (souris db/db [18], résultats personnels). L'expression du RM est clairement augmentée dans le podocyte in vivo en cas de diabète de type I [35].

La spironolactone améliore les lésions glomérulaires observées dans le diabète de type I [18,20,50,51] qui induit une apoptose des podocytes aldo/RM-dépendante [35]. Le blocage pharmacologique du RM prévient la fibrose rénale ainsi que l'augmentation de l'expression du TGF- β 1, de PAI-1, du collagène 1 et 4, de la fibronectine dans le rein diabétique [20,50,51] ainsi que le stress oxydatif local [51]. Le diabète de type II s'accompagne également chez le rat (rat OLEF ou SHR/cp) et la souris (souris db/db), à des degrés variables selon le modèle, d'une atteinte rénale associant augmentation du volume glomérulaire et expansion mésangiale, albuminurie, lésions tubulo-interstitielles, infiltration de macrophages, inflammation (augmentation de l'expression des marqueurs tels que MCP-1, ostéopontine, TGF- β 1, PAI-1 et ED1 par exemple) [18,33,35,50,52]. Une diminution de l'expression de la podocine et de la néphrine traduit une atteinte podocytaire dans ces modèles [33,36]. Ces paramètres sont améliorés voire normalisés par un traitement par les antagonistes du RM (spironolactone ou éplérénone) à des doses non hypotensives [18,33,35,50,52].

4.2.4. Néphrotoxicité de la ciclosporine

La grande majorité des patients transplantés bénéficient d'une thérapie comprenant de la CsA. Toutefois, il y a une forte incidence

de toxicité rénale. Classiquement, on différencie la néphrotoxicité aiguë de la néphrotoxicité chronique. La néphrotoxicité aiguë, qui est la plupart du temps réversible, associe des effets vasculaires (artériopathie aiguë), des effets tubulaires (tubulopathie toxique) et parfois des lésions de micro-angiopathie thrombotique [6,53]. On sait que des lésions histologiques de néphrotoxicité chronique des anti-calcineurines peuvent toucher quasiment tous les transplants au bout de dix ans de traitement si l'on étudie des biopsies réalisées de façon systématique [54]. Plusieurs phénomènes considérés comme irréversibles sont associés : les effets vasculaires (artériopathie hyaline sans doute résultant de l'atteinte aiguë), les effets tubulaires (avec une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle classiquement en bande) ainsi qu'une atteinte glomérulaire (avec un épaississement et une fibrose de la capsule de Bowman et une hyalinose segmentaire et focale) [53]. En pathologie humaine, l'utilisation des traitements bloquant le SRAA, tels que les IEC et les ARAI, a été proposée pour la survie du greffon post-transplantation rénale [53,55,56].

Très récemment, l'aldo et l'activation du RM ont été proposées comme étant des éléments aggravant la néphrotoxicité de la CsA : les effets vaso-actifs et pro-inflammatoires de l'aldo pourraient être impliqués au premier plan [55]. Dans un modèle de néphrotoxicité aiguë chez le rat, Perez-Rojas a montré que l'utilisation de spironolactone permettait de prévenir l'atteinte rénale imputable à la CsA. Cette toxicité semble médiée par des facteurs vaso-actifs [57]. Dans l'atteinte chronique, chez le rat, la spironolactone non seulement améliore la survie [57,58] mais prévient aussi l'altération de la fonction rénale [57–60], diminue l'artériopathie afférente [59] et permet de prévenir la fibrose interstitielle [57–59]. Une autre équipe a montré que l'administration d'éplérénone, toujours chez le rat, permettait de prévenir l'altération de la fonction rénale ainsi que l'artériopathie hyaline imputable à l'utilisation de CsA pendant 21 jours [61]. Enfin, une étude a montré l'intérêt de bloquer le RM lorsque la néphrotoxicité de la CsA est déjà présente : après 18 jours de traitement par CsA, l'administration de spironolactone améliore non seulement la fonction rénale, mais aussi la fibrose interstitielle (et l'expression rénale du gène du TGF- β) et l'épaississement artériolaire et elle diminue l'apoptose et l'excrétion urinaire de kim-1 [58]. Dans un modèle de transplantation rénale chez le rat, l'utilisation d'un antagoniste du RM permet de diminuer la vasculopathie d'allo-greffe et l'infiltration de cellules macrophagiques [60].

5. Minéralocorticoïdes et pathologies rénales : preuves cliniques

Dix ans après la publication du premier cas d'hyperaldostéronisme [1], Conn et al. ont décrit la première cohorte prospective dans laquelle ils identifient près de 85 % de patients protéinuriques [2]. Pendant longtemps, cette protéinurie a été rattachée à l'hypertension qui accompagne l'hyperaldostéronisme primaire voire même à une « néphropathie kaliopénique » [62]. En 2006, une analyse de la cohorte italienne Primary Aldosteronism Prevalence in Italy (PAPY) rapporte que les patients atteints d'une sécrétion inappropriée d'aldo (soit par un adénome sécrétant, soit par un autre hyperaldostéronisme primaire) présentent plus souvent une protéinurie qu'une population témoin (de patients atteints d'hypertension artérielle essentielle) [63].

Dans une étude réalisée chez 28 patients présentant des degrés différents d'IRC, les taux plasmatiques d'aldo étaient corrélés à une altération de la fonction rénale de plus de 50 % [64]. Cela suggérait déjà une association entre atteinte rénale et activation du RM [62]. Par ailleurs, une équipe a publié l'analyse de 95 biopsies rénales de patients présentant une protéinurie et/ou une maladie rénale : les patients fortement protéinuriques (> 2 g/24 h) présentaient une

augmentation de l'expression rénale du RM ; l'aldostéronémie était corrélée avec une altération de la fonction ainsi qu'aux lésions rénales [21].

Il aura fallu attendre près de 40 ans après la première description de Conn pour que l'équipe de Chrysostomou propose l'utilisation d'antagonistes du RM dans la protéinurie [4]. Ces huit premiers patients avec des néphropathies diverses et une protéinurie supérieure à 1 g/24 h ont présenté une nette diminution (de l'ordre de 50 %) de leur protéinurie après la mise sous antagoniste du RM (spironolactone 25 mg/j pendant un mois). Même si cet effet semblait se faire sans modification de la pression artérielle (systolique et/ou diastolique), il a été rapporté qu'il y avait eu une baisse modérée de la pression artérielle moyenne [65]. De nombreuses études ont été publiées concernant l'utilisation de bloqueurs du SRAA dans le but de prévenir l'IRT [66]. Si l'on connaît bien les effets des IEC et des ARAL sur la progression de l'insuffisance rénale, les effets des antagonistes du RM, en clinique, ont été moins étudiés : on connaît surtout leurs effets sur la pression artérielle et sur l'insuffisance cardiaque. Les essais RALES [67] et EPHEsus [68] ont clairement montré leur intérêt dans l'insuffisance cardiaque. En clinique, les études comparant la progression de l'IRC avec ou sans antagonistes du RM sont rares : elles portent le plus souvent sur la correction de l'hypertension artérielle ou, mieux, de la protéinurie, qui sont des facteurs connus de progression de l'IRC [66,69].

L'utilisation d'antagonistes du RM peut être cependant justifiée par l'existence d'un « échappement de l'aldo » chez les patients traités par IEC et/ou ARAL [66]. Les antagonistes du RM sont alors utilisés surtout en traitement adjuvant à un traitement anti-hypertenseur préexistant, permettant de contrôler une hypertension artérielle résistante [66]. Cet « échappement » se définit par une augmentation de l'aldostéronémie après l'instauration d'un

traitement par un médicament bloqueur du SRAA (IEC ou ARAL) par rapport à sa valeur avant traitement [66]. Peu d'études ont permis de bien analyser ce phénomène. L'incidence de cet « échappement » (appelé « aldosterone breakthrough » dans la littérature anglo-saxonne) apparaît être de l'ordre de 10 à 50 % dans les six mois à un an qui suivent l'instauration d'un traitement par IEC et/ou ARAL [70]. Cette grande variabilité semble correspondre à une différence de définition des valeurs seuils à partir desquelles les auteurs prennent en compte les variations d'aldostéronémie. Par ailleurs, l'apparition de ce phénomène ne semble être corrélée ni au type de traitement (entre les classes IEC et ARAL), ni à la molécule ni encore à la dose utilisée [70]. Cet échappement serait associé sur le plan rénal à une protéinurie plus importante [70,71] voire à un déclin plus rapide de la fonction rénale [72]. Certains auteurs ont même montré que lorsque l'aldostéronémie augmentait sous IEC, la protéinurie augmentait avec la baisse de la fonction rénale [72,73]. Les mécanismes physiopathologiques pouvant expliquer ce phénomène sont encore incomplètement compris : l'hypothèse la plus étayée est une activation d'autres enzymes (différente de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) qui pourraient cliver l'angiotensine I en angiotensine II [70] ; cette théorie n'explique cependant pas l'incidence, qui semble équivalente, chez les patients traités par ARAL.

Les effets des antagonistes du RM ont été étudiés, en clinique, non seulement dans la néphropathie diabétique et autres néphropathies protéinuriques mais aussi chez des patients en IRT et chez l'enfant (Tableau 1).

5.1. Néphropathie diabétique

Dès 2003, un essai chez 45 patients diabétiques présentant une protéinurie persistante sous IEC a montré une réduction du rapport

Tableau 1

Caractéristiques et résultats des principales études évaluant les effets des antagonistes du récepteur minéralocorticoïde en néphrologie.

Étude	Réf.	Type d'étude	n	Durée de l'étude (semaines)	Critères d'inclusion	Bras (n)	Intervention	Critère de jugement principal	Résultats
Schjoedt 2005	[76]	Prospective, randomisée, en double insu, cross-over, contre placebo	20	8	DT1, AlbU > 300 mg/j, eDFG > 30 mL/min/1,73 m ²	Placebo (20) / Spiro (20)	Spiro 25 mg/j	Albuminurie	Albuminurie \searrow 30 % vs placebo indépendamment de la PA, pas de changement de eDFG
Schjoedt 2006	[77]	Prospective, randomisée, en double insu, cross-over, contre placebo	20	8	DT1 ou DT2, AlbU > 2,5 g/j, eDFG > 30 mL/min/1,73 m ²	Placebo (20) / Spiro (20)	Spiro 25 mg/j	Albuminurie	Albuminurie \searrow 32 % vs placebo indépendamment de la PA, pas de changement de eDFG
Chrysostomou 2006	[80]	Prospective, randomisée, en double insu, contre placebo	41	12	IRC, AlbU > 1,5 g/j, CrP < 200 µmol/L, IEC > 6 mois	IEC (10) / IEC+ARAL (10) / IEC+Spiro (10) / IEC+ARAL+Spiro (11)	Spiro 25 mg/j	Protéinurie	IEC \searrow protéinurie 1,4 %, IEC+ARAL 16 %, IEC+Spiro 42 %, IEC+ARAL+Spiro 48 % sans changement de PA et eDFG
Bianchi 2006	[81]	Prospective, randomisée, ouverte	165	48	IRC, AlbU > 1 g/j, eDFG > 30 mL/min/1,73 m ² , IEC ou ARAL > 1 an	IEC ou ARAL (82) / IEC ou ARAL+Spiro (83)	Spiro 25 mg/j	Protéinurie	Protéinurie \searrow 54 %, décroissance eDFG plus faible dans le groupe Spiro
Furamatsu 2008	[84]	Prospective, randomisée, ouverte, multicentrique, contrôlée	32	48	IRC, eDFG > 30 mL/min/1,73 m ² , ARAL et IEC > 12 semaines, AlbU persistante > 500 mg/j	IEC+ARAL+TZD ou Furo (15) / IEC+ARAL+Spiro (15)	Spiro 25 mg/j	Protéinurie, fonction rénale, PA, PRA, u-PAI-1	Protéinurie \searrow 58 %, indépendamment de la PA, sans changement de eDFG
Tylicki 2008	[85]	Prospective, randomisée, ouverte, en cross-over	18	8	IRC non diabétique, eDFG > 45 mL/min/1,73 m ² , AlbU > 300 mg/j	IEC+ARAL (18) / IEC+ARAL+Spiro (18)	Spiro 25 mg/j	Protéinurie	Protéinurie \searrow 55 %, indépendamment de la PA

Réf. : référence ; n : nombre de sujets inclus ; DT1 : diabète de type 1 ; AlbU : albuminurie ; eDFG : débit de filtration glomérulaire estimé ; Spiro : spironolactone ; PA : pression artérielle ; DT2 : diabète de type 2 ; IRC : insuffisance rénale chronique ; IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion ; ARAL : antagoniste du récepteur de l'angiotensine ; TZD : diurétique thiazidique ; Furo : furosémide ; ARP : activité rénine plasmatique ; u-PAI-1 : excrétion urinaire de PAI-1.

albuminurie/créatininurie sous spironolactone sans modification de la pression artérielle moyenne [71]. Les mêmes auteurs ont montré, sur un plus petit échantillon, que la diminution de ce rapport était plus importante chez les patients diabétiques que chez les patients protéinuriques atteints d'une autre pathologie rénale [74]. La même année, une autre équipe a publié des résultats concordants : la protéinurie diminuait après un traitement par antagoniste du RM ; cette efficacité était corrélée à la concentration plasmatique d'aldo avant traitement. Après arrêt de l'antagoniste du RM, la protéinurie réapparaissait [75]. On note, dans cette étude ouverte, une bonne corrélation chronologique entre l'utilisation d'un antagoniste du RM et l'évolution de la protéinurie. Toutes ces études étaient jusqu'alors non contrôlées. La première étude contrôlée versus placebo et en cross-over a porté sur 20 patients diabétiques de type I [76] : elle a confirmé la diminution de la protéinurie mais avec une diminution de la pression artérielle et du débit de filtration glomérulaire. De plus, une analyse univariée a montré que la baisse de la protéinurie était indépendante de la baisse de la pression artérielle. Ces résultats ont été confirmés dans une étude de la même équipe chez des patients diabétiques (de type I et II) présentant une protéinurie de débit néphrotique [77]. La dose de spironolactone utilisée dans ces études était de 25 mg/j. Des doses supérieures ont montré une efficacité comparable : une étude de faible effectif a comparé, chez 16 patients diabétiques, l'effet d'une dose de 100 mg/j par rapport à un IEC (le cizalaprill) confirmant l'intérêt du blocage du RM en plus de celui de l'effet propre des IEC [78] ; une dose intermédiaire de spironolactone (50 mg/j) comparée à un inhibiteur calcique a montré que la spironolactone diminuait significativement non seulement l'albuminurie mais aussi un marqueur d'inflammation (MCP-1 urinaire) et d'activation du stress oxydant (8-iso-prostaglandine F2 α urinaire) [79]. Dans ces études, les patients ont bien toléré l'utilisation de spironolactone même à des doses élevées. Il semble donc que des doses faibles montrent un effet comparable à des doses plus élevées.

5.2. Protéinuries non diabétiques

Dans une étude randomisée, contrôlée en double insu, l'utilisation d'un antagoniste du RM a permis de diminuer de façon significative la protéinurie chez 41 patients présentant une protéinurie supérieure à 1,5 g/24 h persistante malgré un traitement par IEC depuis plus de six mois [80]. La spironolactone (25 mg/j) apportait un effet significatif contrairement à l'ajout d'un ARAII. À trois et six mois, cet effet était indépendant de la pression artérielle et ne s'accompagnait ni de modification de la fonction rénale ni d'hyperkaliémie par rapport au groupe traité par ARAII. Dans une étude prospective, randomisée et ouverte chez 165 patients protéinuriques (> 1,0 g/g de créatininurie) atteints d'une néphropathie chronique idiopathique (néphropathie à IgA, glomérulonéphrite membranoproliférative, hyalinose segmentaire et focale, vascularite) avec ou sans IRC (débit de filtration glomérulaire estimé entre 34 et 116 mL/min/1,73 m²) la spironolactone (25 mg/j), comparée à un traitement standard, a permis non seulement de diminuer la protéinurie mais aussi, et surtout, de ralentir la progression de l'IRC évaluée à un an [81]. C'est la seule étude clinique ayant montré un tel effet à ce jour. En 2008, une revue systématique a porté sur 15 études cliniques et résumés évaluant l'effet d'un antagoniste du RM (14 études portant sur la spironolactone et une sur l'éplérénone) chez des patients présentant une maladie rénale chronique protéinurique déjà traités par un autre antagoniste du SRAA (IEC et/ou ARAII) [82]. L'ensemble des études analysées (avec des doses de spironolactone allant de 12,5 à 100 mg/j) conclut à une diminution nettement significative de la protéinurie [82]. La survenue d'une hyperkaliémie n'est pas systématiquement quantifiée mais les taux

d'incidence après mise sous antagoniste du RM semblent se situer entre 3 et 17 % en fonction des seuils retenus par les auteurs [82]. Les résultats sur la diminution de la pression artérielle sont aussi disparates et ne permettent pas de conclure mais son implication dans la diminution de la protéinurie semble, selon les auteurs, de faible importance. En 2009, une méta-analyse a porté sur 11 études cliniques randomisées et contrôlées comparant l'effet d'un antagoniste du RM chez des patients présentant une IRC (non terminale) et une albuminurie ou une protéinurie associée ou non à une néphropathie diabétique déjà traités par un autre bloqueur du SRAA (IEC et/ou ARAII) [83]. Toutes les études concernant la spironolactone sauf une ont utilisé la dose de 25 mg/j (sinon 50 mg/j). Cette méta-analyse montre que la spironolactone en ajout d'un IEC et/ou ARAII diminue significativement la protéinurie sans modifier la fonction rénale mais en diminuant la pression artérielle (systolique et diastolique) et en augmentant le risque d'hyperkaliémie avec un risque relatif de 3,06 et très peu de cas de gynécomastie. Concernant l'éplérénone (à la dose de 50 mg/j), la diminution de la protéinurie apparaît à 12 semaines avec une diminution de la pression artérielle (systolique et diastolique) sans modification de la fonction rénale ni de la kaliémie. Aucun cas de gynécomastie n'a été rapporté [83]. En 2008, une étude japonaise prospective, randomisée, multicentrique et ouverte a montré, chez 32 patients atteints d'une néphropathie protéinurique (> 0,5 g/j), que l'addition de spironolactone (25 mg/j) à un traitement par IEC et ARAII (dit « triple blocage ») diminuait la protéinurie et l'excrétion urinaire de collagène 4 (un marqueur de fibrose rénale) sans modification de la pression artérielle ni de la fonction rénale par rapport à une population contrôle à qui était ajouté un autre diurétique (thiazidique ou de l'anse) [84]. Une autre équipe a montré, dans une étude ouverte prospective et en cross-over, que l'utilisation d'un « triple blocage » pendant huit semaines permettait aussi une diminution de la protéinurie et de l'excrétion urinaire de marqueurs d'atteinte rénale et de fibrose au prix d'une augmentation de la kaliémie [85].

5.3. Insuffisance rénale terminale

Les études menées chez les patients en IRT sont rares. Celles qui sont conduites chez les patients anuriques permettent de mettre en évidence les effets des antagonistes du RM indépendamment de leur action diurétique sur l'épithélium rénal.

Une étude ouverte chez 14 patients hémodialysés a montré que l'administration de 25 mg trois fois par semaine chez des patients avec une fonction rénale résiduelle de l'ordre de 2 à 6 mL/min n'induisait pas d'augmentation du risque d'hyperkaliémie sur une période de deux semaines [86]. Une autre étude observationnelle a retrouvé également la même sécurité d'utilisation chez huit patients hémodialysés chroniques [87]. On note cependant une hyperkaliémie supérieure à 6 mmol/L et la prise en charge spécifique de plusieurs hyperkaliémies supérieures à 5,5 mmol/L mais n'ayant pas entraîné d'interruption du traitement. L'hémodialyse par son épuration spécifique du potassium permettrait ainsi de limiter le risque d'hyperkaliémie [88]. Une autre étude, chez neuf patients hémodialysés, a étudié l'apparition d'une hyperkaliémie après une charge potassique orale avec ou sans spironolactone (50 mg trois fois par semaine) : après deux semaines, il n'y avait pas de différence concernant la kaliémie [89]. En 2009, une étude observationnelle chez 50 patients hémodialysés rapporte une sécurité d'emploi de la spironolactone à la dose de 25 mg/j pendant six mois malgré une augmentation de la kaliémie mais n'ayant pas entraîné de mesure thérapeutique spécifique [90].

Concernant la dialyse péritonéale, les études cliniques sont encore plus rares. Le seul cas publié utilisant la spironolactone (25 mg/j) chez un patient en dialyse péritonéale continue ambulatoire en association à un IEC et un β -bloquant pour une

insuffisance cardiaque, rapporte l'absence d'effet secondaire notable [91]. Une action bénéfique de la spironolactone sur la membrane péritonéale est cependant suggérée chez l'animal par l'expression du RM, de l'ado synthase (CYP11B2) et de la 11 β HSD2 dans des cultures cellulaires primaires de cellules mésothéliales [92] et des fibroblastes [93] issus de péritonées de rats. Dans ces modèles cellulaires, l'expression d'acteurs profibrosants est prévenue par l'utilisation de spironolactone. Chez le mouton, l'utilisation de spironolactone améliore la perméabilité péritonéale étudiée en chambre d'Ussing [94]. Enfin, in vivo, dans un modèle de fibrose péritonéale chez le rat, la spironolactone diminue la fibrose et améliore même le Peritoneal Equilibration Test [95].

Chez cinq patients hémodialysés, une équipe japonaise rapporte une diminution des calcifications vasculaires aortiques après l'utilisation de spironolactone (50 mg/j) [96]. La première étude contrôlée réalisée en cross-over contre placebo a montré chez huit hémodialysés oligo-anuriques une diminution significative de la pression artérielle avec une bonne tolérance (sans hyperkaliémie notamment) [97]. Enfin, dernièrement, une étude prospective, randomisée, contrôlée en double insu, montre l'effet protecteur vasculaire (notamment au niveau de l'épaississement de la paroi carotidienne) de la spironolactone (50 mg trois fois par semaine), avec une sécurité d'emploi chez 30 patients hémodialysés pendant deux ans [98].

5.4. Cas particulier de la néphrologie pédiatrique

Très peu d'études sont disponibles chez l'enfant et aucune n'a été conduite de façon randomisée et en double insu. Les étiologies des néphropathies de l'enfant diffèrent nettement par rapport à l'adulte, limitant ainsi toute extrapolation à partir des études précédentes. Une revue récente [73] mentionne deux études observationnelles. La première concerne des enfants porteurs d'un syndrome d'Alport : la spironolactone (25 mg/j) diminue la protéinurie avec une sécurité d'utilisation à 18 mois [99]. Une autre étude observationnelle, chez 100 enfants traités par un antagoniste du RM, semble rapporter plus souvent une hypokaliémie qu'une hyperkaliémie et une sécurité d'utilisation [100]. Cependant, des études contrôlées à plus large échelle doivent être menées pour apporter plus de preuves de l'efficacité et de l'innocuité de l'utilisation d'antagonistes du RM chez l'enfant.

5.5. Effets secondaires des antagonistes du RM

Les effets secondaires liés à l'utilisation des antagonistes du RM peuvent être scindés en effets ioniques (hyperkaliémie et déplétion hydrosodée par l'effet diurétique) et en effets anti-androgéniques (gynécomastie, troubles du cycle menstruel, impuissance, etc.). L'utilisation des antagonistes du RM est classiquement déconseillée chez les patients insuffisants rénaux en raison des risques d'hyperkaliémie [101,102], d'autant plus s'ils viennent s'ajouter à un autre antagoniste du SRAA [103]. Plusieurs études suggèrent surtout une fréquente inadéquation aussi bien de la prescription d'antagonistes du RM (par rapport aux critères d'inclusion de RALES [67] et EPHEUS [68]) que de son suivi biologique (notamment la kaliémie et la créatininémie) [104]. Pour ce qui est des effets indésirables anti-androgéniques, il semblerait qu'ils apparaissent surtout pour de fortes doses (> 150 mg/j de spironolactone) [105] et lors de l'utilisation d'un antagoniste dit non sélectif (la spironolactone) [83]. La différence dans l'incidence des effets secondaires (notamment anti-androgéniques) entre éplérénone et spironolactone semble provenir de la différence de sélectivité de ces deux molécules pour le RM et le récepteur des androgènes : la spironolactone antagonise aussi le récepteur des androgènes contrairement à l'éplérénone qui est spécifique du RM [105].

6. Conclusion

L'aldo et/ou l'activation inappropriée du RM peuvent être considérées comme un facteur de risque pour les pathologies cardiaques mais aussi rénales chez l'homme, au-delà de leur rôle hémodynamique bien connu. L'intérêt thérapeutique du blocage du RM en clinique doit encore être étayé dans de nombreux cas : chez le patient en IRT (anurique ou non, en hémodialyse et en dialyse péritonéale), le patient protéinurique, le patient transplanté, l'enfant, etc. Son efficacité dans le ralentissement de la progression de l'IRC doit aussi être explorée de façon très rigoureuse. D'autres situations cliniques nécessitent au moins des études cliniques préliminaires : la néphrotoxicité de la ciclosporine et/ou la vasculopathie du rejet chronique. À l'heure de la néphroprotection par le blocage du SRAA, les antagonistes du RM montrent un bénéfice croissant. L'utilisation des antagonistes du RM est limitée par leurs effets secondaires. Aux doses utilisées pour la néphroprotection (25 à 50 mg/j), les effets anti-androgéniques semblent rares. Les patients qui recevront ces traitements devront être suivis de près, notamment en ce qui concerne la kaliémie, surtout s'ils bénéficient déjà d'un traitement par bloqueur du SRAA.

Conflit d'intérêt

Jean-Philippe Bertocchio : aucun.

Frédéric Jaisser : aucun.

Remerciements

J.-P. B. a bénéficié d'un financement pour son Master 2 Recherche de la part de la Fondation pour la recherche médicale. Les auteurs souhaitent remercier Nicolette Farman pour ses remarques et ses relectures attentives.

Références

- [1] Conn JW. Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J Lab Clin Med* 1955;45:3–17.
- [2] Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM. Clinical characteristics of primary aldosteronism from an analysis of 145 cases. *Am J Surg* 1964;107:159–72.
- [3] Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 1996;98:1063–8.
- [4] Chrysostomou A, Becker G. Spironolactone in addition to ACE inhibition to reduce proteinuria in patients with chronic renal disease. *N Engl J Med* 2001;345:925–6.
- [5] Bonvalet JP. Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int Suppl* 1998;65:S49–56.
- [6] Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000;47:119–25.
- [7] Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978;2:1323–7.
- [8] Viengchareun S, Le Menuet D, Martinier L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 2007;5:e012.
- [9] Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F181–92.
- [10] Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987;237:268–75.
- [11] Nguyen Dinh Cat A, Griol-Charhbil V, Loufrani L, Labat C, Benjamin L, Farman N, et al. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J* 2010;24(7):2454–63.
- [12] Funder JW. The role of aldosterone and mineralocorticoid receptors in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007;7:151–7.
- [13] Gekle M, Grossmann C. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Arch* 2009;458:231–46.
- [14] Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol* 2010;6:261–73.
- [15] Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouve P, Wassef M, et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 1995;26:971–8.

- [16] Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120:893–901.
- [17] Funder JW. Mineralocorticoid receptor activation and oxidative stress. *Hypertension* 2007;50:840–1.
- [18] Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 2008;117:2253–61.
- [19] Kosugi T, Heinig M, Nakayama T, Matsuo S, Nakagawa T. eNOS knockout mice with advanced diabetic nephropathy have less benefit from renin-angiotensin blockade than from aldosterone receptor antagonists. *Am J Pathol* 2010;176:619–29.
- [20] Taira M, Toba H, Murakami M, Iga I, Serizawa R, Murata S, et al. Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2008;589:264–71.
- [21] Quinkler M, Zehnder D, Eardley KS, Lepenies J, Howie AJ, Hughes SV, et al. Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation* 2005;112:1435–43.
- [22] Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishio M, et al. Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R946–54.
- [23] Nagata K, Obata K, Xu J, Ichihara S, Noda A, Kimata H, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension* 2006;47:656–64.
- [24] Takeda M, Tatsumi T, Matsunaga S, Hayashi H, Kimata M, Honsho S, et al. Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. *Hypertens Res* 2007;30:427–37.
- [25] de Resende MM, Kausar K, Mill JG. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci* 2006;22;78(26):3066–73.
- [26] DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Enhancement of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor density in the microcirculation of the spontaneously hypertensive rat. *Microcirculation* 2004;11:69–78.
- [27] Krug AW, Allenhofer L, Monticone R, Spinetti G, Gekle M, Wang M, et al. Elevated mineralocorticoid receptor activity in aged rat vascular smooth muscle cells promotes a proinflammatory phenotype via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase and epidermal growth factor receptor-dependent pathways. *Hypertension* 2010;55:1476–83.
- [28] Tada Y, Kitazato KT, Tamura T, Yagi K, Shimada K, Kinouchi T, et al. Role of mineralocorticoid receptor on experimental cerebral aneurysms in rats. *Hypertension* 2009;54:552–7.
- [29] Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirono Y, Hirata Y. Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology* 2008;149:1009–14.
- [30] Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawarazaki W, Kurihara H, Tanaka H, et al. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* 2008;14:1370–6.
- [31] Stanisic V, Lonard DM, O'Malley BW. Modulation of steroid hormone receptor activity. *Prog Brain Res* 2010;181:153–76.
- [32] Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, Estess J, Warden MP, Gomez-Sanchez MT, et al. Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 2006;147:1343–8.
- [33] Nishiyama A, Yao L, Fan Y, Kyaw M, Kataoka N, Hashimoto K, et al. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension* 2005;45:710–6.
- [34] Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, et al. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 2005;46:1039–45.
- [35] Lee SH, Yoo TH, Nam BY, Kim DK, Li JJ, Jung DS, et al. Activation of local aldosterone system within podocytes is involved in apoptosis under diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297:F1381–90.
- [36] Nagase M, Yoshida S, Shibata S, Nagase T, Gotoda T, Ando K, et al. Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:3438–46.
- [37] Rocha R, Stier Jr CT, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000;141:3871–4388.
- [38] Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1802–10.
- [39] Kobayashi N, Hara K, Tojo A, Onozato ML, Honda T, Yoshida K, et al. Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule. PKC ϵ siRNA-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway. *Hypertension* 2005;45:538–44.
- [40] Chun TY, Chander PN, Kim JW, Pratt JH, Stier Jr CT. Aldosterone, but not angiotensin II, increases profibrotic factors in kidney of adrenalectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E305–12.
- [41] Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Gutweiler A, Jellison J, Wiedmeyer CE, et al. Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates glomerular filtration barrier remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F1013–22.
- [42] Nagase M, Shibata S, Yoshida S, Nagase T, Gotoda T, Fujita T. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 2006;47:1084–93.
- [43] Chander PN, Rocha R, Ranaudo J, Singh G, Zuckerman A, Stier Jr CT. Aldosterone plays a pivotal role in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy in SHRSP. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1990–7.
- [44] Quan ZY, Walser M, Hill GS. Adrenalectomy ameliorates ablative nephropathy in the rat independently of corticosterone maintenance level. *Kidney Int* 1992;41:326–33.
- [45] Aldigier JC, Kanjanbuchi T, Ma LJ, Brown NJ, Fogo AB. Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3306–14.
- [46] Gullulu M, Akdag I, Kahvecioglu S, Filiz G, Savci V. Aldosterone blockage in proliferative glomerulonephritis prevents not only fibrosis, but proliferation as well. *Ren Fail* 2006;28:509–14.
- [47] Nakhoul F, Khankin E, Yacoub A, Kawachi H, Karraam T, Awaad H, et al. Eplerenone potentiates the antiproteinuric effects of enalapril in experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F628–37.
- [48] Monrad SU, Killen PD, Anderson MR, Bradke A, Kaplan MJ. The role of aldosterone blockade in murine lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R5.
- [49] Sun GP, Kohno M, Guo P, Nagai Y, Miyata K, Fan YY, et al. Involvements of Rho-kinase and TGF- β pathways in aldosterone-induced renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2193–201.
- [50] Fujisawa G, Okada K, Muto S, Fujita N, Itabashi N, Kusano E, et al. Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 2004;66:1493–502.
- [51] Yuan J, Jia R, Bao Y. Beneficial effects of spironolactone on glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2007;8:118–26.
- [52] Han SY, Kim CH, Kim HS, Jee YH, Song HK, Lee MH, et al. Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1362–72.
- [53] Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:481–508.
- [54] Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326–33.
- [55] Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F2–9.
- [56] Heinze G, Mitterbauer C, Regele H, Kramar R, Winkelmayer WC, Curhan GC, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II type 1 receptor antagonist therapy is associated with prolonged patient and graft survival after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:889–99.
- [57] Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA, Cruz C, Martinez de la Maza L, Gamba G, et al. Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F1020–3.
- [58] Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, Trujillo J, Vaidya VS, Uribe N, et al. Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F131–9.
- [59] Feria I, Pichardo I, Juarez P, Ramirez V, Gonzalez MA, Uribe N, et al. Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003;63:43–52.
- [60] Waanders F, Rienstra H, Boer MW, Zandvoort A, Rozing J, Navis G, et al. Spironolactone ameliorates transplant vasculopathy in renal chronic transplant dysfunction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F1072–9.
- [61] Nielsen FT, Jensen BL, Marcussen N, Skott O, Bie P. Inhibition of mineralocorticoid receptors with eplerenone alleviates short-term cyclosporin A nephrotoxicity in conscious rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2777–83.
- [62] Hollenberg NK. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney Int* 2004;66:1–9.
- [63] Rossi GP, Bernini G, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Giacchetti G, et al. Renal damage in primary aldosteronism: results of the PAPY Study. *Hypertension* 2006;48:232–8.
- [64] Hene RJ, Boer P, Koomans HA, Mees EJ. Plasma aldosterone concentrations in chronic renal disease. *Kidney Int* 1982;21:98–101.
- [65] Epstein FH. Spironolactone and ACE inhibition in chronic renal failure. *N Engl J Med* 2002;346:456–7.
- [66] Jain G, Campbell RC, Warnock DG. Mineralocorticoid receptor blockers and chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:1685–91.
- [67] Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709–17.
- [68] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309–21.
- [69] Ruggerenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). *Kidney Int* 1998;53:1209–16.
- [70] Bombard AS, Klemmer PJ. The incidence and implications of aldosterone breakthrough. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007;3:486–92.

- [71] Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T. Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003;41:64–8.
- [72] Schjoedt KJ, Andersen S, Rossing P, Tarnow L, Parving HH. Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. *Diabetologia* 2004;47:1936–9.
- [73] Ku E, Campese VM. Role of aldosterone in the progression of chronic kidney disease and potential use of aldosterone blockade in children. *Pediatr Nephrol* 2009;24:2301–7.
- [74] Sato A, Hayashi K, Saruta T. Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. *Am J Hypertens* 2005;18:44–9.
- [75] Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am J Kidney Dis* 2005;46:45–51.
- [76] Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR, Boomsma F, Rossing P, Tarnow L, et al. Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005;68:2829–36.
- [77] Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR, Boomsma F, Tarnow L, Rossing P, et al. Beneficial impact of spironolactone on nephrotic range albuminuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2006;70:536–42.
- [78] Rachmani R, Slavachevsky I, Amit M, Levi Z, Kedar Y, Berla M, et al. The effect of spironolactone, cilazapril and their combination on albuminuria in patients with hypertension and diabetic nephropathy is independent of blood pressure reduction: a randomized controlled study. *Diabet Med* 2004;21:471–5.
- [79] Takebayashi K, Matsumoto S, Aso Y, Inukai T. Aldosterone blockade attenuates urinary monocyte chemoattractant protein-1 and oxidative stress in patients with type 2 diabetes complicated by diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2214–7.
- [80] Chrysostomou A, Pedagogos E, MacGregor L, Becker GJ. Double-blind, placebo-controlled study on the effect of the aldosterone receptor antagonist spironolactone in patients who have persistent proteinuria and are on long-term angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy, with or without an angiotensin II receptor blocker. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:256–62.
- [81] Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006;70:2116–23.
- [82] Bombardier AS, Kshirsagar AV, Amamoo MA, Klemmer PJ. Change in proteinuria after adding aldosterone blockers to ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers in CKD: a systematic review. *Am J Kidney Dis* 2008;51:199–211.
- [83] Navaneethan SD, Nigwekar SU, Sehgal AR, Strippoli GF. Aldosterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:542–51.
- [84] Furumatsu Y, Nagasawa Y, Tomida K, Mikami S, Kaneko T, Okada N, et al. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system triple blockade on non-diabetic renal disease: addition of an aldosterone blocker, spironolactone, to combination treatment with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker. *Hypertens Res* 2008;31:59–67.
- [85] Tylicki L, Rutkowski P, Renke M, Larczynski W, Aleksandrowicz E, Lysiak-Szydłowska W, et al. Triple pharmacological blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in nondiabetic CKD: an open-label crossover randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2008;52:486–93.
- [86] Saudan P, Mach F, Perneger T, Schnetzler B, Stoermann C, Fumeaux Z, et al. Safety of low-dose spironolactone administration in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2359–63.
- [87] Hussain S, Dreyfus DE, Marcus RJ, Biederman RW, McGill RL. Is spironolactone safe for dialysis patients? *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2364–8.
- [88] Ponda MP, Hostetter TH. Aldosterone antagonism in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:668–77.
- [89] Michea L, Vukusich A, Gonzalez M, Zehnder C, Marusic ET. Effect of spironolactone on K(+) homeostasis and ENaC expression in lymphocytes from chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004;66:1647–53.
- [90] Matsumoto Y, Kageyama S, Yakushigawa T, Arihara K, Sugiyama T, Mori Y, et al. Long-term low-dose spironolactone therapy is safe in oligoanuric hemodialysis patients. *Cardiology* 2009;114:32–8.
- [91] Hausmann MJ, Liel-Cohen N. Aldactone therapy in a peritoneal dialysis patient with decreased left ventricular function. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:2035–6.
- [92] Okazaki A, Mori Y, Nakata M, Kimura T, Sonomura K, Sakoda C, et al. Peritoneal mesothelial cells as a target of local aldosterone action: upregulation of connective tissue growth factor expression via serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase 1. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:151–160.
- [93] Yamahara H, Kishimoto N, Nakata M, Okazaki A, Kimura T, Sonomura K, et al. Direct aldosterone action as a profibrotic factor via ROS-mediated SGK1 in peritoneal fibroblasts. *Kidney Blood Press Res* 2009;32:185–93.
- [94] Karioti A, Hatzoglou C, Zarogiannis S, Deligiorgi T, Kourti P, Giannopoulou M, et al. Spironolactone increases permeability of visceral sheep peritoneum. *Adv Perit Dial* 2009;25:16–9.
- [95] Nishimura H, Ito Y, Mizuno M, Tanaka A, Morita Y, Maruyama S, et al. Mineralocorticoid receptor blockade ameliorates peritoneal fibrosis in new rat peritonitis model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F1084–93.
- [96] Nitta K, Akiba T, Nihei H. Aldosterone blockade and vascular calcification in hemodialysis patients. *Am J Med* 2003;115:250.
- [97] Gross E, Rothstein M, Dombek S, Juknis HI. Effect of spironolactone on blood pressure and the renin-angiotensin-aldosterone system in oligo-anuric hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;46:94–101.
- [98] Vukusich A, Kunstmann S, Varela C, Gainza D, Bravo S, Sepulveda D, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of spironolactone on carotid intima-media thickness in nondiabetic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5(8):1380–7.
- [99] Kaito H, Nozu K, Iijima K, Nakanishi K, Yoshiya K, Kanda K, et al. The effect of aldosterone blockade in patients with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2006;21:1824–9.
- [100] Buck ML. Clinical experience with spironolactone in pediatrics. *Ann Pharmacother* 2005;39:823–8.
- [101] Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, Kopp A, Austin PC, Laupacis A, et al. Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med* 2004;351:543–51.
- [102] Ritz E, Koleganova N. Aldosterone in uremia – beyond blood pressure. *Blood Purif* 2010;29:111–3.
- [103] Schepkens H, Vanholder R, Billiouw JM, Lameire N. Life-threatening hyperkalemia during combined therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and spironolactone: an analysis of 25 cases. *Am J Med* 2001;110:438–41.
- [104] Ko DT, Juurlink DN, Mamdani MM, You JJ, Wang JT, Donovan LR, et al. Appropriateness of spironolactone prescribing in heart failure patients: a population-based study. *J Card Fail* 2006;12:205–10.
- [105] Epstein M. Aldosterone receptor blockade and the role of eplerenone: evolving perspectives. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1984–92.

Annexe 2 : Revue « activation du Récepteur Minéralocorticoïde dans les maladies rénales chroniques »

Cette revue publiée dans le journal *Kidney International* en 2011 (153) reprend l'ensemble des données physiopathologiques et clinique de l'implication de l'activation du RM et de l'intérêt de son antagonisme au cours des maladies rénales chroniques (cf. Le Récepteur Minéralocorticoïde dans les maladies rénales, p. 30).

Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease

Jean-Philippe Bertocchio¹, David G. Warnock² and Frederic Jaisser¹

¹Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U872 Team 1, Paris, France and ²Division of Nephrology, Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA

Slowing the progression of chronic kidney diseases (CKDs) requires new and effective treatment approaches. Aldosterone classically acts on the distal nephron: it facilitates sodium reabsorption, potassium secretion, and participates in blood pressure control. Recently, new targets of aldosterone have been described including the heart and the vasculature, and other kidney cells such as mesangial cells, podocytes, and renal fibroblasts. The pathophysiological implications of increased mineralocorticoid receptor (MR) expression and activation (either dependent on aldosterone or direct ligand-independent activation) and its blockade have been illustrated with *ex vivo* in cell cultures and *in vivo* in experimental animal models of CKD, including diabetic and hypertensive nephropathies, and glomerulopathies. The beneficial effects of the MR antagonists are independent of the hypertensive effect of aldosterone, indicating that blocking the activation of the MR may have unique clinical importance. Several studies have reported efficacy and safety studies with spironolactone or eplerenone in patients with kidney diseases. In this review, we discuss the recent results reported in experimental and clinical research in this field, and emphasize the direct activation of the MR that can occur in pathological states associated with CKD, even in the absence of increased circulating levels of aldosterone.

Kidney International (2011) **79**, 1051–1060; doi:10.1038/ki.2011.48; published online 16 March 2011

KEYWORDS: aldosterone; kidney diseases; mineralocorticoid; proteinuria; receptors

In 1955, Conn¹ described a young female with primary aldosteronism and proteinuria. In 1964, he described the first 145 cases of proven primary aldosteronism: proteinuria was present in 85% of the patients.² This proteinuria was attributed to hypertension present in Conn's syndrome until animal studies showed that mineralocorticoid hormones, especially aldosterone, could cause proteinuria in absence of hypertension.³ In 2001, a brief report of the use of a mineralocorticoid receptor (MR) antagonist in eight proteinuric patients was published; a 54% decrease in proteinuria was reported after 4 weeks of treatment with spironolactone.⁴ Several additional studies have explored the role of aldosterone and MR in proteinuria, and in the progression of chronic kidney diseases (CKD).

Prospective randomized controlled trials have demonstrated reduction in mortality in patients with severe heart failure,⁵ for those who develop heart failure following acute myocardial infarction,⁶ and those with mild heart failure⁷ who are treated with MR blockers (MRBs). Patients with CKD have not been included in these large-scale prospective outcome studies, primarily because of concerns about hyperkalemia. The aim of this review is to consider the implications of aldosterone, the MR, and MRBs in the progression and treatment of CKD, and solidify the base upon which prospective outcome studies of CKD can be based.

NEW CONCEPTS OF THE PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF ALDOSTERONE

Aldosterone controls sodium reabsorption and potassium secretion in the distal nephron, and has a major role in volume and blood pressure homeostasis. The hormone functions in the distal nephron after binding to the MR, a ligand-dependant transcription factor, which binds to specific hormone response elements.⁸ Transepithelial sodium reabsorption is regulated acutely via increased expression/activity of the apical epithelial sodium channel, and in the longer term by changes in the expression of the basolateral Na⁺/K⁺-ATPase.^{9,10} Membrane expression of the sodium channel is tightly controlled by aldosterone, through regulation of expression/activity of ubiquitylation pathways.¹¹ Aldosterone and glucocorticoids (corticosterone in rodents) have similar binding affinities for the MR. Aldosterone

Correspondence: Frederic Jaisser, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM U872 Team 1, 15 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 75270, France. E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

Received 11 October 2010; revised 1 December 2010; accepted 21 December 2010; published online 16 March 2011

specificity in the distal nephron is ensured by the expression and activity of the enzyme 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, which converts cortisol into cortisone (having a weak affinity for MR), preventing full MR occupancy by cortisol, despite plasma concentrations 100- to 1000-fold greater than those of aldosterone.¹²

Cloning of the MR¹³ and development of specific antibodies permitted mapping of the MR expression in the distal nephron (convoluted distal tubule and collecting duct), distal colon, and sweat glands, all sites previously known as classical targets of aldosterone.^{12,14} MR is also expressed in tissues and cell types wherein vectorial sodium transport does not occur, indicating novel and yet unknown roles of aldosterone and MR activation that does not serve whole-body sodium homeostasis. In some of these nonclassical targets (like vascular endothelium), MR is co-expressed with 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 indicating that aldosterone is the preferred MR ligand in these cells.¹⁵ In other targets (cardiomyocytes, vascular smooth muscle cells, neurons, adipocytes, and keratinocytes), the absence of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression suggests that the MR ligand is cortisol (or corticosterone) rather than aldosterone.^{15,16}

Aldosterone defends the extracellular fluid volume during acute volume loss or salt depletion.^{12,14} However, MR activation may become maladaptive,¹⁷ with sustained activation inducing pathological consequences like hypertension, extracellular matrix remodeling, apoptosis, or inflammation. The 'coincidence' model proposes that adding two or more pathological inputs will have a synergic effect resulting in inappropriate activation of MR.¹⁷ These triggers include dietary salt intake, which could affect cellular responses (cellular volume, membrane stiffness, and inflammation), oxidative stress (induced by angiotensin or other hormones), and ligand-independent MR activation. Therefore, during modest, but coincident increases of aldosterone or MR expression, oxidative stress, and sodium load will induce molecular and functional alterations and pathophysiology.

MRs are expressed in heart and blood vessels, posing the question of the pathophysiological role of MR activation in these nonclassical target tissues. The pharmacological model, in which unilateral nephrectomy and chronic aldosterone infusion are associated with a high salt load, induces an increase of blood pressure and pathological consequences with perivascular and extracellular matrix remodeling in kidney and heart.^{18,19} The administration of nonhypotensive doses of MR antagonists, has clearly shown differential responses to hemodynamic effects and profibrotic, proinflammatory, and increased oxidative stress of aldosterone and/or activation of MR.²⁰

MR expression is not fixed, but can be modulated in various pathophysiological contexts like diabetes,^{21–23} CKD with heavy proteinuria,²⁴ cardiac failure,^{25,26} myocardial infarction,^{27,28} high blood pressure,²⁹ vascular aging,³⁰ or cerebral aneurysm.³¹ It has also recently been shown that MR

activation can occur independently of ligand. MR activation by Rac1 has been demonstrated in vascular endothelium and podocytes.^{32,33} Post-translational modifications of MR like phosphorylation, as demonstrated for the glucocorticoid or estrogen receptors are also possible.³⁴ A further layer of complexity is offered by the possibility for intracellular 'cross-talk' between the MR and the angiotensin type 1 receptor and the epidermal growth factor receptor, mediated by phosphorylation cascades.^{35–37} This novel concept requires that the traditional distinction³⁸ between 'genomic' and 'non-genomic' effects of aldosterone be viewed in a different perspective. These results indicate that MR activation does not necessarily require increases in circulating aldosterone levels, and can explain the beneficial effects of MR antagonism in various pathological conditions wherein circulating aldosterone levels are not elevated.

MINERALOCORTICOIDS AND RENAL DISEASES: EXPERIMENTAL AND CLINICAL EVIDENCE

MR expression in the kidney

MR expression has been demonstrated in the distal nephron (Figure 1).^{12,14} MR immunolocalization has been challenging, but the generation of novel antipeptide monoclonal anti-MR antibodies by CE Gomez-Sanchez³⁹ has permitted MR immuno-detection in tissues where expression level is lower than in the distal nephron. MR is clearly expressed in vascular endothelial cells and in the vascular smooth muscle cells of inter-lobar arteries in the mouse kidney.¹⁵ MR expression is not normally detected in the glomerulus, but has been demonstrated *ex vivo* in cultured podocytes,³³ mesangial cells,⁴⁰ and renal fibroblasts.⁴¹ *In vivo*, MR appears to be expressed in nonclassical targets like podocytes or mesangial cells only during pathological conditions like type 1 diabetes in the rat,⁴² and in spontaneous hypertensive rats with metabolic syndrome.⁴³

Pathophysiological consequences of MR activation in experimental models of kidney disease

The renal consequences of MR activation have been described during aldosterone infusion, with suppression of aldosterone synthesis after adrenalectomy, and with pharmacological MR blockade (Figure 2).

Hypertensive nephropathy. MR blockade reduces the vascular changes induced by blockade of nitric oxide synthesis during high-sodium intake,^{44,45} in the Dahl salt-sensitive rat,⁴⁶ in the stroke-prone spontaneous hypertensive rat,⁴⁷ and the ren2 transgenic rat.⁴⁸ These effects are observed without blood pressure reduction, indicating a nonhemodynamic protective effect of MR blockade. The underlying mechanisms include decreased oxidative stress, inflammation, and extracellular matrix. Podocytes injury is evidenced by decreased expression of podocin, synaptopodine, and nephrin, and increased apoptosis.⁴⁹ Intrarenal vessels develop angiosclerosis and microangiopathy secondary to MR activation.^{44,50} Aldosterone modulates the expression of proinflammatory and profibrosis molecules, as well as

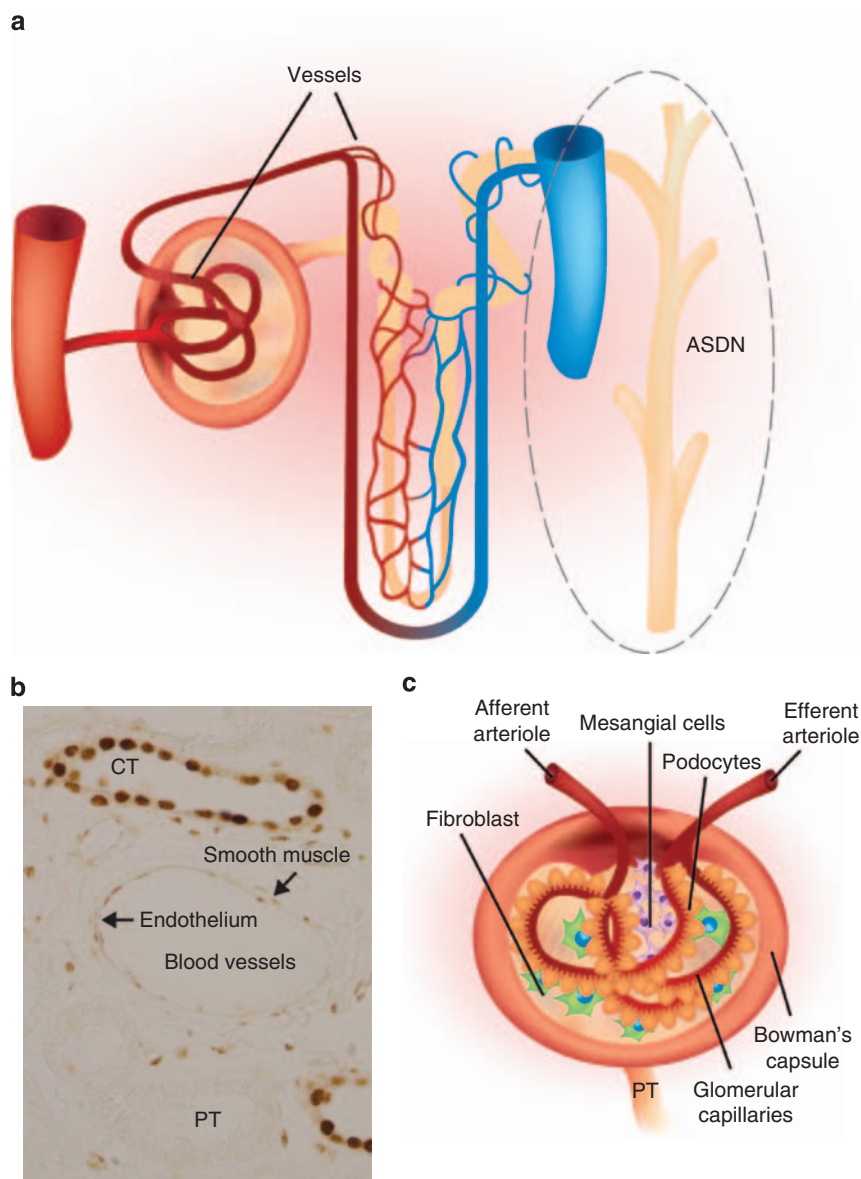


Figure 1 | Mineralocorticoid receptor expression in the kidney. (a) The classical target of aldosterone is the aldosterone-sensitive distal nephron (ASDN) but blood vessels have also been shown to express the mineralocorticoid receptor (MR). (b) Immunolocalization of the MR in the kidney. In addition to collecting tubule (CT), both endothelial and smooth muscle cells physiologically express MR. (c) Proposed cellular targets in kidney diseases in the glomerulus: podocytes, mesangial cells, and glomerular capillaries. PT, proximal tubule.

components of the NADPH oxidase complex.^{47,49} The endothelium is altered with increased expression of adhesion molecules as well as decreased nitric oxide synthase expression.⁴⁶ Eplerenone prevents aldosterone-induced Rac1 activation in the endothelium.³² Altogether, these various targets could contribute to the beneficial effects of the MR antagonists in hypertensive nephropathy.

Chronic kidney disease. Decreased glomerular filtration, glomerulosclerosis, and proteinuria associated to subtotal nephrectomy are observed after aldosterone infusion³ and are blunted by adrenalectomy⁵¹ or spironolactone.⁵² MR blockade slows the progression of preexisting lesions,⁵² and

prevents proliferation, interstitial fibrosis, and proteinuria in a model of glomerulonephritis,⁵³ in adriamycin-induced nephropathy,⁵⁴ and in a lupus nephritis model.⁵⁵

Activation of the Rho kinase pathway and Rac1 could be involved in the progression of CKD.^{33,46,48,56} In a transgenic model with constitutive activation of the Rac1/Rho kinase pathway presenting with nephrotic syndrome, MR blockade prevented the development of proteinuria in the absence of changes in arterial blood pressure.³³ MR may be a direct target for Rac1, which could modulate MR activation within the podocyte, even in the absence of increased circulating aldosterone.³³

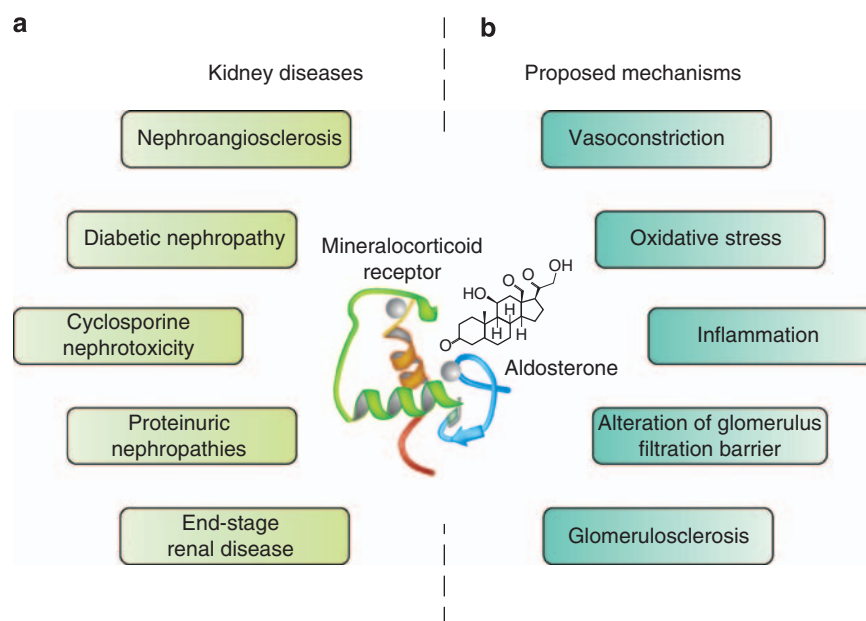


Figure 2 | Implication of aldosterone and the mineralocorticoid receptor (MR) in renal pathophysiology. (a) Aldosterone and/or mineralocorticoid receptor are involved in various kidney diseases in human and/or experimental models. (b) Proposed pathophysiological mechanisms involved in renal lesions linked to aldosterone/MR activation.

Diabetic nephropathy. The role of aldosterone and/or MR activation in diabetic nephropathy has been demonstrated in experimental models. Renal expression of MR is increased in animals with streptozotocin-induced type 1 diabetes^{21,23,42} and in type 2 diabetes (db/db mice,²¹ F. Jaisser, personal communication). Spironolactone has beneficial effects on glomerular lesions observed in models of type 1 diabetes,^{21,23,57,58} which are associated with aldosterone—MR dependent podocyte apoptosis.⁴² Pharmacological MR blockade prevents renal fibrosis and increased expression of transforming growth factor- β 1, PAI-1, type 1 and 4 collagens, and fibronectin^{23,57,58} as well as local oxidative stress.⁵⁸ Type 2 diabetes is associated in the rat and mouse models with renal lesions, including mesangial expansion, albuminuria, tubulointerstitial lesions, macrophage infiltration, inflammation, and increased expression of markers such as MCP-1, osteopontin, transforming growth factor- β 1, and PAI-1.^{21,40,42,57,59} Decrease podocin and nephrin expression reflects podocyte injury in these models.^{40,43} These molecular or functional parameters are improved with MR blockade.^{21,40,42,57,59}

Cyclosporine nephrotoxicity. Acute and chronic nephrotoxicity complicates the course of transplant patients treated with cyclosporine A (CsA). Acute nephrotoxicity, includes vascular effects (acute arteriopathy), tubular damage (toxic tubulopathy), and occasionally, thrombotic microangiopathy.^{9,60} Histological lesions related to chronic CsA nephrotoxicity are present after 10 years when analyzed with protocol biopsies.⁶¹ Several irreversible changes have been described: vascular effects (hyaline arteriopathy), tubular lesions (tubular atrophy and interstitial ‘stripped’ fibrosis), and glomerular lesions (enlarged Bowman’s capsule and segmental and focal hyalinosis).⁶⁰ Angiotensin-converting

enzyme-inhibitors (ACEI) or angiotensin II receptor blockers (ARB) have been used to limit renal function decline after transplantation.^{60,62,63}

Renin activity is reduced during CsA treatment, presumably due to sodium retention and extracellular volume expansion.⁶⁴ Paradoxically, aldosterone and MR activation have been proposed as deleterious factors in this setting. However, circulating renin and aldosterone activities do not necessarily reflect tissue activation of MR.⁶⁵ Vasoactive and proinflammatory effects of aldosterone could explain the beneficial effects of MR blockade during CsA nephrotoxicity.⁶² Perez-Rojas *et al.*⁶⁶ reported that spironolactone prevented renal damage in a model of CsA nephrotoxicity. Vasoconstriction could be due to an ‘over-activation’ of MR as recently described in transgenic mice with increased MR expression in the vascular endothelium.¹⁵ Endothelial MR regulates vasoconstrictor tone and blood pressure, so MR blockade could limit vasoconstriction and ischemia and thus reduce CsA nephrotoxicity. In rats, spironolactone improved survival,^{66,67} prevented decreased renal function,^{66–69} afferent arteriopathy,⁶⁸ and interstitial fibrosis.^{66–68} Eplerenone prevented renal dysfunction and hyaline arteriopathy in the chronic CsA nephrotoxicity model.⁷⁰ In a model of allotransplantation in the rat, MR antagonism decreased allograft vasculopathy and macrophage infiltration.⁶⁹

Renin-angiotensin-aldosterone system blockade and aldosterone breakthrough in CKD

The importance of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) blockade for slowing the progression to end-stage renal disease is well recognized.³⁷ The effects of MR antagonists on the progression of CKD are less well described

than the effects of ACEIs and ARBs. The RALES,⁵ EPHESUS,⁶ and most recently, the EMPHASIS_HF⁷ studies have clearly shown the beneficial impact on outcome of MR blockade in heart failure. Studies of the effects of MR antagonists on the progression of CKD are limited, without any outcome studies examining loss of kidney function, progression to end-stage renal disease, or cardiovascular death as the primary outcome.^{37,71}

The use of MR antagonists in CKD is suggested by aldosterone 'breakthrough',^{37,72,73} defined as an increase in circulating aldosterone after the initiation of a RAAS blockade as compared with baseline values, despite blockade of the effects of angiotensin II.³⁷ Aldosterone breakthrough occurs in 10–50% of the patients within 6–12 months after the initiation of a RAAS blocker.⁷⁴ This variability may reflect different definitions for the thresholds of plasma aldosterone increase. Furthermore, aldosterone breakthrough does not seem to be correlated with the class of treatment (ACEI or ARB) or the specific agent,⁷⁴ and is associated with increased proteinuria,^{74,75} or a faster decline in kidney function.⁷³ Several studies have shown a direct relationship between increases in plasma aldosterone after ACEI treatment and increases in proteinuria and decreases in kidney function.^{73,76} The underlying cause of aldosterone breakthrough is not fully defined, but a popular hypothesis invokes activation of non-ACEI enzymes that cleave angiotensin I in angiotensin II,⁷⁴ and stimulate aldosterone synthesis. This hypothesis does not explain the equivalent incidence of aldosterone breakthrough when ARBs are used compared with ACEIs. Studies of the angiotensinogen knockout mouse are also relevant.⁷⁷ RAAS was presumably totally ablated in this model, and aldosterone secretion was driven by serum potassium, especially during dietary salt restriction. Hyperkalemia needs to be evaluated as a potential contributor to aldosterone breakthrough in patients receiving RAAS blockade,⁷⁸ as potassium has long been recognized as an important stimulus for aldosterone secretion.^{5,79}

Clinical studies of mineralocorticoids and kidney diseases

Conn² described the first prospective cohort of patients with primary aldosteronism, among whom 85% of the patients presented with proteinuria, which was attributed to hypertension and 'kaliopenic nephropathy'.⁸⁰ The Primary Aldosteronism Prevalence in Italy Study showed that patients presenting with hyperaldosteronism more often have proteinuria than control patients with essential hypertension.⁸¹

Plasma aldosterone levels have been correlated with alterations in kidney function in CKD,⁸² suggesting an association between kidney dysfunction and MR activation.⁸⁰ Patients with a heavy proteinuria (>2 g per day) have increased renal expression of MR and increased plasma aldosterone levels that were correlated with the severity of renal biopsy findings.²⁴ Chrysostomou *et al.*⁴ first proposed the use of MR antagonists in proteinuric patients with CKD, and described a 54% reduction in proteinuria (3.8 ± 2.5 versus 1.8 ± 1.0 g per day) with spironolactone (25 mg per

day for 4 weeks). Initial reports^{4,83} and more recent analysis describe decreased blood pressure after MR antagonism.^{84,85} Other studies showed reduction in proteinuria independent of effects on blood pressure at the doses used.^{75,86–89} Whether part of the beneficial effects of MR antagonism in CKD are independent of effects on blood pressure is a point of continuing debate. Table 1 summarizes the number of published studies of MR blockade in CKD and proteinuria.

Diabetic nephropathy. In 2003, a trial in 45 patients with diabetes mellitus and persistent proteinuria during ACEI treatment showed a decrease in urinary albumin/creatinine ratio with the addition of spironolactone, without changes in mean blood pressure,⁷⁵ and the decrease in proteinuria was more marked in diabetic patients than in other proteinuric patients.⁸⁶ The same year, another team published similar results: proteinuria decreased under MR antagonist; the efficiency was correlated with the aldosterone level before the initiation of the treatment, and after MR antagonist withdrawal, proteinuria reappeared.⁹⁰ In this open-label trial, the reduction of proteinuria correlated with MR blockade. This was confirmed in another clinical trial in type II diabetic patients.⁹¹ The first controlled, crossover, versus placebo trial was performed in type I diabetic patients:⁹² the authors confirmed that proteinuria was decreased, but there was also a decrease in blood pressure and glomerular filtration rate. These results have been confirmed by at least two other studies.^{92,93} The dose of spironolactone used in these studies was 25 mg per day. Higher doses have shown similar efficiency: a trial in 53 diabetic patients used spironolactone 50 mg per day during 1 year and showed a decrease in albuminuria;⁹⁴ and a trial comparing the effect of spironolactone 100 mg per day to ACEI (cilazapril) in diabetic patients confirmed the benefit of MR antagonism in addition to the effect of ACEI.⁹¹ Spironolactone decreased albuminuria, renal excretion of MCP-1, and activation of oxidative stress (as estimated with renal excretion of 8-iso-prostaglandin F_{2α}) better than a calcium-channel blocker in diabetic subjects.⁹⁵ Only one study has been performed with eplerenone in type 2 diabetic patients: the tolerability was similar to spironolactone and proteinuria was decreased after 3 months.⁸³

Nondiabetic proteinurias. In a randomized, controlled, double-blind trial, was decreased by MR blockade in 41 patients with baseline proteinuria >1.5 g per day who had already received ACEI treatment for more than 6 months.⁸⁸ Spironolactone (25 mg per day) had a beneficial effect, whereas ARB treatment did not. At 3 and 6 months after starting spironolactone treatment, there were independent effects on proteinuria and blood pressure. Glomerular filtration rate and hyperkalemia were not different in the spironolactone-treated patients compared with the ARB-treated group. In a prospective, randomized, and open-label study of proteinuric patients (>1.0 g/g of creatinine) with nondiabetic forms of CKD and estimated glomerular filtration rate from 34 to 116 ml/min per 1.73 m², spironolactone (25 mg per day) decreased proteinuria and slowed the

Table 1 | Effects on proteinuria of mineralocorticoid receptor blockers in clinical studies

Author ^{ref}	Study design	n	Months	Kidney disease	Arms (n)	Intervention treatment (mg/day)	Inclusion criteria				Primary end point	Secondary end points	Results	Blood pressure
							Proteinuria (g/24 h)	Renal function	Proteinuria	Renal function				
Chrysostomou ⁴	Prospective, open-label, uncontrolled	8	1	Proteinuric nephropathy	Spiro (8)	Spiro 25	3.81 ± 2.5	81 ± 48	Proteinuria	BP, renal function	BP, renal function	Proteinuria	↘ Mean BP	
Sato ⁷⁵	Prospective, open-label, controlled	45	6	Diabetic nephropathy	ACEI without aldo escape (27)/ACEI+aldo escape spiro (18)	Spiro 25	UACR: 389 ± 109 mg/g	> 60	UACR	BP	BP	Albuminuria	No change	
Sato ⁸⁶	Placebo, open-label, uncontrolled	32	3	Proteinuric nephropathy	Diabetic (17)/non-diabetic (15)	Spiro 25	1.18 ± 0.10/ 1.142 ± 0.203	89.1 ± 3.8/94 ± 3.4	Proteinuria	u-NAG, u-β2m, u-colliv	u-NAG, u-β2m, u-colliv	Proteinuria	No change	
Rachmani ⁹¹	Prospective, randomized, controlled	46	12	Diabetic nephropathy	Spiro 100: > 50 mg/day (23)/Cizalapid+spiro 50 mg/day (23)	Spiro 100/50	UACR: 456/ 451 mg/g	5Cr ≤ 160 μmol/l	UACR	BP, renal function	BP, renal function	Proteinuria	No change	
Bianchi ⁹⁰	Prospective, open-label, uncontrolled pilot	42	2	Proteinuric nephropathy	Spiro (42)	Spiro 25	2.09 ± 0.16 ^a	56.8 ± 4.7 ^a	Proteinuria	Renal function, hyperkalemia	Renal function, hyperkalemia	Proteinuria	No change	
Schjoedt ⁹²	Prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled, cross-over	20	2	Diabetic nephropathy	Placebo (20)/spiro (20)	Spiro 25	AlbU > 300 mg/24h	> 30	Albuminuria	BP, renal function	BP, renal function	Albuminuria	Independent	
Schjoedt ⁹³	Prospective, randomized, double-masked, placebo-controlled, crossover	20	2	Diabetic nephropathy	Placebo (20)/spiro (20)	Spiro 25	AlbU > 2500 mg/24h	> 30	Albuminuria	BP, renal function	BP, renal function	Albuminuria	Independent	
van den Meiracker ⁹⁴	Prospective, double-blind, placebo-controlled, parallel group	53	12	Diabetic nephropathy	ACEI or ARB+placebo (29)/spiro (24)	Spiro 50	AlbU: 1002/770	64/87	Proteinuria	BP, renal function, hyperkalemia	BP, renal function, hyperkalemia	Albuminuria	Independent	
Epstein ⁸³	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled	268	3	Diabetic nephropathy	Enalapril+placebo (91)/EPL50 (91)/EPL100 (86)	EPL 50/100	UACR: 280/422/ 240mg/g	74/73/75	Proteinuria, hyperkalemia	SBP, DBP	SBP, DBP	Proteinuria	Independent	
Chrysostomou ⁸⁸	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled	41	3	Proteinuric nephropathy	ACEI (10)/ACEI+ARB (10)/ACEI+spiro (10)/ACEI+ARB+spiro (11)	Spiro 25	2.6 ± 1.6/2.5 ± 1.8/ 20.2 ± 1.4/3.1 ± 1.9	81.6/68/59.4/57.6	Proteinuria	BP, renal function, hyperkalemia	BP, renal function, hyperkalemia	Proteinuria	No change	
Bianchi ⁸⁷	Prospective, randomized, open-label	165	12	Idiopathic GN	Conventional therapy (82)/+spiro (83)	Spiro 25	2.1 ± 0.08/ 2.0 ± 0.07	62.4 ± 2.4/62.2 ± 2.1	Proteinuria	Renal function	Renal function	Proteinuria	↘ SBP and DBP	
Furumatsu ⁸⁹	Prospective, randomized, open-label, multicenter, controlled	32	12	Non-diabetic proteinuric nephropathy	Enalapril+losartan+TZD or furo (15)/spiro (15)	Spiro 25	u-Prot/u-Cr: 1.44 ± 0.28/ 1.42 ± 0.28 g/g	68.9 ± 7.8/91.8 ± 11.8	Proteinuria	Renal function, BP, PRA, u-PAL-1	Renal function, BP, PRA, u-PAL-1	Proteinuria	Independent	
Tylicki ⁹⁷	Prospective, randomized, open-label, controlled, crossover	18	2	Non-diabetic proteinuric nephropathy	ACEI+ARB (18)/ACEI+ARB+spiro (18)	Spiro 25	0.97 ± 0.18	107.8	Proteinuria	u-NAG, u-α1m, u-PIIINP	u-NAG, u-α1m, u-PIIINP	Proteinuria	Independent	

Abbreviations: ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; AlbU, albuminuria; ARB, angiotensin receptor blocker; BP, blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; EPL, eplerenone; furo, furosemide; GN, glomerulonephritis; n, number of patients; PRA, plasma renin activity; SBP, systolic blood pressure; SCr, serum creatinine; spiro, spironolactone; TZD, thiazide; UACR, urine albumin/creatinine ratio; u-colliv, collagen IV urinary excretion; u-Cr, creatinuria; u-NAG, N-acetyl-β-D-glucosaminidase urinary excretion; u-PIIINP, amino-terminal propeptide of type III procollagen urinary excretion; u-Prot, proteinuria; u-PAL-1, plasminogen activator inhibitor-1 urinary excretion; u-α1m, α1microglobulin urinary excretion; u-β2m, β2-microglobulin urinary excretion.

^aData are expressed ± s.e.m.

progression of CKD over 12 months duration of follow-up.⁸⁷ This study is the only one that clearly demonstrates that spironolactone slowed progression of CKD. A recent systematic review on 15 clinical trials and abstracts evaluated the effect of a MR blockade in patients with CKD and proteinuria who were also receiving another RAAS blocker; there was a uniform decrease in proteinuria.⁹⁶ The incidence of hyperkalemia during MR antagonist was between 3 and 17%, depending on the definition used for hyperkalemia.⁹⁶ In 2008, a prospective, randomized, multi-centric, open-trial in 32 patients with proteinuric nephropathy (>0.5 g per day) showed that addition of spironolactone (25 mg per day) to ACEI and ARB treatment decreased proteinuria and renal excretion of type 4 collagen (a renal marker of fibrosis) without any modification of blood pressure or kidney function when compared with the control group.⁸⁹ Another report of a prospective, open-label, crossover trial, showed that 'triple blockade' during 8 weeks decreased proteinuria as well as urinary excretion of a kidney injury biomarker, decreased fibrosis but increased serum potassium.⁹⁷

In 2009, a meta-analysis of 11 controlled and randomized trials compared the effect of a MR antagonist in patients with CKD, albuminuria, or proteinuria due to diabetic and nondiabetic nephropathy, who were already receiving another RAAS antagonist (ACEI or ARB).⁸⁵ All studies, but one, used 25 mg per day spironolactone. This meta-analysis showed that spironolactone significantly decreased proteinuria when added to ACEI and/or ARB treatment without any change in renal function, but with a decrease in systemic blood pressure. The risk of hyperkalemia was higher and a few cases of gynecomastia were reported. Eplerenone (50 mg per day) treatment decreased of proteinuria after 12 weeks associated with a decrease of blood pressure (systolic and diastolic) but without change in kidney function or hyperkalemia. Gynecomastia was not reported with eplerenone.⁸⁵

A large-scale prospective, placebo-controlled evaluation of eplerenone versus conventional agents in hypertensive patients with proteinuria is underway, and is referred to as the EVALUATE Trial.⁹⁸ The primary end point is reduction in urine albumin/creatinine ratio after 12 months of active drug treatment, with secondary outcomes that include reduction in blood pressure, hyperkalemia, and slowing of progression of CKD.

End-stage renal disease. In most of the clinical studies, the primary end point was reduction in proteinuria and/or albuminuria. The possibility that the beneficial effects of MR antagonism may not require an effect on proteinuria is raised by studies in anuric end-stage renal disease patients showing cardiovascular effects of MR antagonists.^{99–101} Those performed in anuric patients are informative about the effects of MR antagonists that are independent from their action on kidney function and proteinuria. An open-label trial in 14 hemodialyzed patients with a residual renal function (from 2 to 6 ml/min) showed that 25 mg per day spironolactone, three times a week for 2 weeks, did not cause hyperkalemia.¹⁰² Another observational trial reported a similar safety

profile in eight chronic hemodialyzed patients.¹⁰³ One case of hyperkalemia >6 mmol/l and one with >5.5 mmol/l were reported but without need to modify treatment.¹⁰³ Hemodialysis, by effecting potassium removal, seems to limit the risk of hyperkalemia.¹⁰⁴ Another trial in nine hemodialyzed patients examined the risk of hyperkalemia after an oral load of potassium, with or without spironolactone (50 mg per day three times a week): after 2 weeks, hyperkalemia was not worsened by spironolactone.¹⁰⁵ In 2009, an observational study in 50 hemodialyzed patients showed that 25 mg per day spironolactone could be used safely for 6 months.¹⁰⁶

A single report describes the use of spironolactone in association with an ACEI and a β -blocker in a patient with heart failure who received chronic peritoneal dialysis: there was no particular adverse effect.¹⁰⁷

Decreased of aortic vascular calcifications has been described with spironolactone treatment in five hemodialysis patients.⁹⁹ A controlled, crossover versus placebo trial in eight hemodialysis patients showed a significant blood pressure decrease without hyperkalemia.¹⁰⁰ A prospective, randomized, controlled trial in 30 hemodialysis patients showed decreased carotid intimal thickness with spironolactone and minimal safety issues over 2 years of treatment.¹⁰¹ These studies have been summarized in a recent meta-analysis.¹⁰⁸

Pediatric cases and pregnancy. Very few studies are available in children. The etiologies of nephropathies are a bit different than for adults, so it is difficult to extrapolate from the trials performed in adult patients to children. A recent review mentioned two observational trials.⁷⁶ The first one described children with Alport's syndrome: spironolactone (25 mg per day) safely decreased proteinuria with 18 months of use.¹⁰⁹ Another retrospective study, in 100 MR antagonist-treated children, reported hypokalemia rather than hyperkalemia.¹¹⁰ Randomized controlled trials with adequate power have to be done to evaluate the efficiency and the safety of MR antagonists in children as well as adults.

Eplerenone has been assigned to pregnancy risk category B; there are not animal studies with evidence of teratogenicity, and there are no controlled data in human pregnancy. Spironolactone has been assigned to pregnancy risk category C, with adverse effects seen in animal studies and no adequate studies in humans. Both drugs should probably be avoided in pregnancy.

Adverse effects associated with MR antagonists. The adverse effects in MR antagonists could be divided in ionic effects (hyperkalemia and salt depletion related to the diuretic effect) and anti-androgenic effects (gynecomastia, disorders of the menstrual cycle, and so on, related to the nonspecific androgen receptor blockade). The use of MR antagonists has not been recommended in CKD patients because of the concerns about hyperkalemia,^{111,112} which often occurs when multiple RAAS blockers are used.¹¹³ Several authors suggest that the MR antagonists are not used often enough in heart failure, based on comparisons to the inclusion criteria for the RALES⁵ and EPHEUS⁶ studies, and that the biological follow-up (monitoring of serum creatinine

and potassium) have not been optimal.¹¹⁴ Anti-androgenic adverse effects appeared with high doses spironolactone.^{85,115} Spironolactone and eplerenone seem to have different adverse event profiles, particularly the anti-androgenic effects. This difference is due to the lower selectivity for MR of spironolactone; spironolactone is also an antagonist for the androgenic receptor in contrast to eplerenone, which is relatively more MR specific.¹¹⁵

The safety issues related to hyperkalemia may have overshadowed the potential beneficial effects of MRBs in patients with CKD.^{38,116,117} Indeed, the risks associated with hypokalemia seem to be more consequential than the risks associated with hyperkalemia in patients with CKD.^{118,119} What has not been properly emphasized is the possibility that hyperkalemia may stimulate aldosterone secretion and contribute to aldosterone breakthrough, thus limiting the beneficial effects of MRBs and RAAS blockade in patients with CKD.⁷⁸ Several approaches to controlling hyperkalemia during RAAS blockade have been recently summarized, and include dietary restriction, increased colonic secretion of potassium, and the use of adjunctive diuretic therapy.³⁷

CONCLUSION

Aldosterone and/or direct MR activation are important risk factors for various forms of heart disease. It seems likely that MR activation has similar effects in CKD, beyond any effects on blood pressure. The beneficial effects of MR antagonism have not been fully explored in several clinical situations: in end-stage renal disease patients (with or without anuria, in hemodialysis, and peritoneal dialysis), in proteinuric patients, in kidney transplant patients, and in children. The use of MR blockade to slow the progression of CKD needs to be rigorously explored with properly powered outcome studies. In other clinical conditions, such as cyclosporine and/or transplant vasculopathy, the effects of MRB need to be better defined. As a complement to more aggressive RAAS blockade (with higher doses of ACEIs and ARBs) in proteinuric kidney diseases, there is growing interest in the cardiovascular benefits of adding MR antagonism to RAAS blockade. Concerns about hyperkalemia have prevented the organization of large-scale outcome studies in CKD similar to RALES,⁵ EPHEUS,⁶ and EMPHASIS_HF.⁷ The current recommendations for MR antagonism in heart failure specifically exclude patients with CKD; perhaps this therapeutic window can be extended if effective means of managing hyperkalemia can be developed for use during long-term outcome studies, both from the safety perspective as well as limiting the detrimental effects of hyperkalemia and aldosterone breakthrough on the efficacy of RAAS blockade.

DISCLOSURE

DGW is a consultant for Relypsa Pharmaceuticals, Santa Clara, CA. The remaining authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

J-PB held a Master fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale, Paris, France. Grants from INSERM, the Agence Nationale

pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0156-01), the Leducq Fondation (Transatlantic Network of Excellence in Cardiovascular Disease), and the GENZYME Investigator Sponsored Research Program supported this work.

DISCLAIMER

The authors take full responsibility for the contents of this review. The services of a medical writer were not used, and the work has not undergone any review by any outside agency or pharmaceutical concern.

REFERENCES

- Conn JW. Presidential address I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome. *J Lab Clin Med* 1955; **45**: 3–17.
- Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM. Clinical characteristics of primary Aldosteronism from an analysis of 145 Cases. *Am J Surg* 1964; **107**: 159–172.
- Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 1996; **98**: 1063–1068.
- Chrysostomou A, Becker G. Spironolactone in addition to ACE inhibition to reduce proteinuria in patients with chronic renal disease. *N Engl J Med* 2001; **345**: 925–926.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; **341**: 709–717.
- Pitt B, Remme W, Zannad F et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1309–1321.
- Zannad F, McMurray JJV, Krum H et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2010; **364**: 11–21.
- Bonvalet JP. Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney Int Suppl* 1998; **65**: S49–S56.
- Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000; **47**: 119–125.
- Calne RY, White DJ, Thiru S et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; **2**: 1323–1327.
- Vienchareun S, Le Menuet D, Martinier L et al. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 2007; **5**: e012.
- Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F181–F192.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987; **237**: 268–275.
- Meneton P, Loffing J, Warnock DG. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: F593–F601.
- Nguyen Dinh Cat A, Griol-Charhbil V, Loufrani L et al. The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J* 2010; **24**: 2454–2463.
- Funder JW. The role of aldosterone and mineralocorticoid receptors in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; **7**: 151–157.
- Gekle M, Grossmann C. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Arch* 2009; **458**: 231–246.
- Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D et al. Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension* 1995; **26**: 971–978.
- Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992; **120**: 893–901.
- Funder JW. Mineralocorticoid receptor activation and oxidative stress. *Hypertension* 2007; **50**: 840–841.
- Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and proinflammatory adipokines. *Circulation* 2008; **117**: 2253–2261.
- Kosugi T, Heinig M, Nakayama T et al. eNOS knockout mice with advanced diabetic nephropathy have less benefit from renin-angiotensin blockade than from aldosterone receptor antagonists. *Am J Pathol* 2010; **176**: 619–629.

23. Taira M, Toba H, Murakami M *et al.* Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2008; **589**: 264–271.
24. Quinkler M, Zehnder D, Eardley KS *et al.* Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria. *Circulation* 2005; **112**: 1435–1443.
25. Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K *et al.* Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **292**: R946–R954.
26. Nagata K, Obata K, Xu J *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats. *Hypertension* 2006; **47**: 656–664.
27. Takeda M, Tatsumi T, Matsunaga S *et al.* Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts. *Hypertens Res* 2007; **30**: 427–437.
28. de Resende MM, Kauser K, Mill JG. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci* 2006; **78**: 3066–3073.
29. DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Enhancement of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor density in the microcirculation of the spontaneously hypertensive rat. *Microcirculation* 2004; **11**: 69–78.
30. Krug AW, Allenhofer L, Monticone R *et al.* Elevated mineralocorticoid receptor activity in aged rat vascular smooth muscle cells promotes a proinflammatory phenotype via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase and epidermal growth factor receptor-dependent pathways. *Hypertension* 2010; **55**: 1476–1483.
31. Tada Y, Kitazato KT, Tamura T *et al.* Role of mineralocorticoid receptor on experimental cerebral aneurysms in rats. *Hypertension* 2009; **54**: 552–557.
32. Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I *et al.* Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology* 2008; **149**: 1009–1014.
33. Shibata S, Nagase M, Yoshida S *et al.* Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* 2008; **14**: 1370–1376.
34. Stanicic V, Lonard DM, O'Malley BW. Modulation of steroid hormone receptor activity. *Prog Brain Res* 2010; **181**: 153–176.
35. Di Zhang A, Cat AN, Soukaseum C *et al.* Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension* 2008; **52**: 1060–1067.
36. Montezano AC, Touyz RM. Networking between systemic angiotensin II and cardiac mineralocorticoid receptors. *Hypertension* 2008; **52**: 1016–1018.
37. Jain G, Campbell RC, Warnock DG. Mineralocorticoid receptor blockers and chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; **4**: 1685–1691.
38. Schrier RW. Hyperkalemia: a threat to RAAS inhibition? *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 245–246.
39. Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG *et al.* Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 2006; **147**: 1343–1348.
40. Nishiyama A, Yao L, Fan Y *et al.* Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension* 2005; **45**: 710–716.
41. Nagai Y, Miyata K, Sun GP *et al.* Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 2005; **46**: 1039–1045.
42. Lee SH, Yoo TH, Nam BY *et al.* Activation of local aldosterone system within podocytes is involved in apoptosis under diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**: F1381–F1390.
43. Nagase M, Yoshida S, Shibata S *et al.* Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 3438–3446.
44. Rocha R, Stier Jr CT, Kifor I *et al.* Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000; **141**: 3871–3878.
45. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE *et al.* Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **283**: H1802–H1810.
46. Kobayashi N, Hara K, Tojo A *et al.* Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule, PKCepsilon-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway. *Hypertension* 2005; **45**: 538–544.
47. Chun TY, Chandler PN, Kim JW *et al.* Aldosterone, but not angiotensin II, increases profibrotic factors in kidney of adrenalectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **295**: E305–E312.
48. Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates glomerular filtration barrier remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**: F1013–F1022.
49. Nagase M, Shibata S, Yoshida S *et al.* Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 2006; **47**: 1084–1093.
50. Chandler PN, Rocha R, Ranaudo J *et al.* Aldosterone plays a pivotal role in the pathogenesis of thrombotic microangiopathy in SHRSP. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1990–1997.
51. Quan ZY, Walser M, Hill GS. Adrenalectomy ameliorates ablative nephropathy in the rat independently of corticosterone maintenance level. *Kidney Int* 1992; **41**: 326–333.
52. Aldiger JC, Kanjanbuchi T, Ma LJ *et al.* Regression of existing glomerulosclerosis by inhibition of aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 3306–3314.
53. Gullulu M, Akdag I, Kahvecioglu S *et al.* Aldosterone blockage in proliferative glomerulonephritis prevents not only fibrosis, but proliferation as well. *Ren Fail* 2006; **28**: 509–514.
54. Nakhoul F, Khankin E, Yaccob A *et al.* Eplerenone potentiates the antiproteinuric effects of enalapril in experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **294**: F628–F637.
55. Monrad SU, Killen PD, Anderson MR *et al.* The role of aldosterone blockade in murine lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2008; **10**: R5.
56. Sun GP, Kohno M, Guo P *et al.* Involvements of Rho-kinase and TGF-beta pathways in aldosterone-induced renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2193–2201.
57. Fujisawa G, Okada K, Muto S *et al.* Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 2004; **66**: 1493–1502.
58. Yuan J, Jia R, Bao Y. Beneficial effects of spironolactone on glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2007; **8**: 118–126.
59. Han SY, Kim CH, Kim HS *et al.* Spironolactone prevents diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1362–1372.
60. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; **4**: 481–508.
61. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL *et al.* The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2326–2333.
62. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: F2–F9.
63. Heinze G, Mitterbauer C, Regele H *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II type 1 receptor antagonist therapy is associated with prolonged patient and graft survival after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 889–899.
64. Bantle JP, Boudreau RJ, Ferris TF. Suppression of plasma renin activity by cyclosporine. *Am J Med* 1987; **83**: 59–64.
65. Lassila M. Interaction of cyclosporine A and the renin-angiotensin system; new perspectives. *Curr Drug Metab* 2002; **3**: 61–71.
66. Perez-Rojas JM, Derive S, Blanco JA *et al.* Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**: F1020–F1030.
67. Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C *et al.* Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F131–F139.
68. Feria I, Pichardo I, Juarez P *et al.* Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 2003; **63**: 43–52.
69. Waanders F, Rienstra H, Boer MW *et al.* Spironolactone ameliorates transplant vasculopathy in renal chronic transplant dysfunction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **296**: F1072–F1079.
70. Nielsen FT, Jensen BL, Marcussen N *et al.* Inhibition of mineralocorticoid receptors with eplerenone alleviates short-term cyclosporin A nephrotoxicity in conscious rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 2777–2783.
71. Ruggerenti P, Perna A, Mosconi L *et al.* Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. 'Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia' (GISEN). *Kidney Int* 1998; **53**: 1209–1216.
72. Pitt B. 'Escape' of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther* 1995; **9**: 145–149.

73. Schjoedt KJ, Andersen S, Rossing P *et al.* Aldosterone escape during blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic nephropathy is associated with enhanced decline in glomerular filtration rate. *Diabetologia* 2004; **47**: 1936–1939.
74. Bombard AS, Klemmer PJ. The incidence and implications of aldosterone breakthrough. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007; **3**: 486–492.
75. Sato A, Hayashi K, Naruse M *et al.* Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 2003; **41**: 64–68.
76. Ku E, Campese VM. Role of aldosterone in the progression of chronic kidney disease and potential use of aldosterone blockade in children. *Pediatr Nephrol* 2009; **24**: 2301–2307.
77. Okubo S, Niimura F, Nishimura H *et al.* Angiotensin-independent mechanism for aldosterone synthesis during chronic extracellular fluid volume depletion. *J Clin Invest* 1997; **99**: 855–860.
78. Miao Y, Dobres D, Lambers Heerspink HJ *et al.* Increased serum potassium affects renal outcomes: a *post hoc* analysis of the Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan (RENAAL) trial. *Diabetologia* 2010; **54**: 44–50.
79. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 2004; **84**: 489–539.
80. Hollenberg NK. Aldosterone in the development and progression of renal injury. *Kidney Int* 2004; **66**: 1–9.
81. Rossi GP, Bernini G, Desideri G *et al.* Renal damage in primary aldosteronism: results of the PAPY Study. *Hypertension* 2006; **48**: 232–238.
82. Hene RJ, Boer P, Koomans HA *et al.* Plasma aldosterone concentrations in chronic renal disease. *Kidney Int* 1982; **21**: 98–101.
83. Epstein M, Williams GH, Weinberger M *et al.* Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; **1**: 940–951.
84. Epstein FH. Spironolactone and ACE inhibition in chronic renal failure. *N Engl J Med* 2002; **346**: 456–457.
85. Navaneethan SD, Nigwekar SU, Sehgal AR *et al.* Aldosterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; **4**: 542–551.
86. Sato A, Hayashi K, Saruta T. Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. *Am J Hypertens* 2005; **18**: 44–49.
87. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006; **70**: 2116–2123.
88. Chrysostomou A, Pedagogos E, MacGregor L *et al.* Double-blind, placebo-controlled study on the effect of the aldosterone receptor antagonist spironolactone in patients who have persistent proteinuria and are on long-term angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy, with or without an angiotensin II receptor blocker. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; **1**: 256–262.
89. Furumatsu Y, Nagasawa Y, Tomida K *et al.* Effect of renin-angiotensin-aldosterone system triple blockade on non-diabetic renal disease: addition of an aldosterone blocker, spironolactone, to combination treatment with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker. *Hypertens Res* 2008; **31**: 59–67.
90. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study. *Am J Kidney Dis* 2005; **46**: 45–51.
91. Rachmani R, Slavachevsky I, Amit M *et al.* The effect of spironolactone, cilazapril and their combination on albuminuria in patients with hypertension and diabetic nephropathy is independent of blood pressure reduction: a randomized controlled study. *Diabet Med* 2004; **21**: 471–475.
92. Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR *et al.* Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005; **68**: 2829–2836.
93. Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR *et al.* Beneficial impact of spironolactone on nephrotic range albuminuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2006; **70**: 536–542.
94. van den Meiracker AH, Baggen RG, Pauli S *et al.* Spironolactone in type 2 diabetic nephropathy: effects on proteinuria, blood pressure and renal function. *J Hypertens* 2006; **24**: 2285–2292.
95. Takebayashi K, Matsumoto S, Aso Y *et al.* Aldosterone blockade attenuates urinary monocyte chemoattractant protein-1 and oxidative stress in patients with type 2 diabetes complicated by diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 2214–2217.
96. Bombard AS, Kshirsagar AV, Amamoo MA *et al.* Change in proteinuria after adding aldosterone blockers to ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers in CKD: a systematic review. *Am J Kidney Dis* 2008; **51**: 199–211.
97. Tylicki L, Rutkowski P, Renke M *et al.* Triple pharmacological blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in nondiabetic CKD: an open-label crossover randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2008; **52**: 486–493.
98. Ando K, Ohtsu H, Arakawa Y *et al.* Rationale and design of the Eplerenone combination Versus conventional Agents to Lower blood pressure on Urinary Antialbuminuric Treatment Effect (EVALUATE) trial: a double-blinded randomized placebo-controlled trial to evaluate the antialbuminuric effects of an aldosterone blocker in hypertensive patients with albuminuria. *Hypertens Res* 2010; **33**: 616–621.
99. Nitta K, Akiba T, Nihei H. Aldosterone blockade and vascular calcification in hemodialysis patients. *Am J Med* 2003; **115**: 250.
100. Gross E, Rothstein M, Dombek S *et al.* Effect of spironolactone on blood pressure and the renin-angiotensin-aldosterone system in oligo-anuric hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; **46**: 94–101.
101. Vukusich A, Kunstmann S, Varela C *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of spironolactone on carotid intima-media thickness in nondiabetic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; **5**: 1380–1387.
102. Saudan P, Mach F, Perneger T *et al.* Safety of low-dose spironolactone administration in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 2359–2363.
103. Hussain S, Dreyfus DE, Marcus RJ *et al.* Is spironolactone safe for dialysis patients? *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 2364–2368.
104. Ponda MP, Hostetter TH. Aldosterone antagonism in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; **1**: 668–677.
105. Michea L, Vukusich A, Gonzalez M *et al.* Effect of spironolactone on K(+) homeostasis and ENaC expression in lymphocytes from chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; **66**: 1647–1653.
106. Matsumoto Y, Kageyama S, Yakushigawa T *et al.* Long-term low-dose spironolactone therapy is safe in oligoanuric hemodialysis patients. *Cardiology* 2009; **114**: 32–38.
107. Hausmann MJ, Liel-Cohen N. Aldactone therapy in a peritoneal dialysis patient with decreased left ventricular function. *Nephrol Dial Transplant* 2002; **17**: 2035–2036.
108. Chua D, Lo A, Lo C. Spironolactone use in heart failure patients with end-stage renal disease on hemodialysis: is it safe? *Clin Cardiol* 2010; **33**: 604–608.
109. Kaito H, Nozu K, Iijima K *et al.* The effect of aldosterone blockade in patients with Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2006; **21**: 1824–1829.
110. Buck ML. Clinical experience with spironolactone in pediatrics. *Ann Pharmacother* 2005; **39**: 823–828.
111. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS *et al.* Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med* 2004; **351**: 543–551.
112. Ritz E, Koleganova N. Aldosterone in uremia—beyond blood pressure. *Blood Purif* 2010; **29**: 111–113.
113. Schepkens H, Vanholder R, Billioud JM *et al.* Life-threatening hyperkalemia during combined therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitors and spironolactone: an analysis of 25 cases. *Am J Med* 2001; **110**: 438–441.
114. Ko DT, Juurlink DN, Mamdani MM *et al.* Appropriateness of spironolactone prescribing in heart failure patients: a population-based study. *J Card Fail* 2006; **12**: 205–210.
115. Epstein M. Aldosterone receptor blockade and the role of eplerenone: evolving perspectives. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 1984–1992.
116. Funder JW. Eplerenone in chronic renal disease: the EVALUATE trial. *Hypertens Res* 2010; **33**: 539–540.
117. Weir MR, Rolfe M. Potassium homeostasis and renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; **5**: 531–548.
118. Einhorn LM, Zhan M, Hsu VD *et al.* The frequency of hyperkalemia and its significance in chronic kidney disease. *Arch Intern Med* 2009; **169**: 1156–1162.
119. Korgaonkar S, Tilea A, Gillespie BW *et al.* Serum potassium and outcomes in CKD: insights from the RRI-CKD cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; **5**: 762–769.

Annexe 3 : Notice d'information diététique aux patients participant à l'étude EpleCsAT: Safety.

Cette fiche d'information sur les recommandations diététiques a été remise à chaque patient ayant participé à l'étude EpleCsAT: Safety (cf. p. 48) : elle s'intéressait principalement à la consommation d'aliments riches en potassium mais ne rappelait que des éléments habituellement recommandés chez les patients transplantés et insuffisants rénaux.



Fiche d'information diététique

Etude EpleCsAT Safety

Etude de la sécurité d'emploi de l'éplérénone chez le patient transplanté rénal sous ciclosporine
N° EudraCT 2011-003759-20 / Ref. ANSM A11066-3201

Afin de normaliser votre kaliémie, la mise en place de règles d'hygiène alimentaire est nécessaire :

- consommation limitée de certains aliments
- exclusion de certains autres

Les aliments à limiter




Les pommes de terre, fruits secs et légumes frais contiennent une quantité non négligeable de potassium.

Les aliments à exclure




Le chocolat, les dattes, figes et fruits à coque mais aussi les céréales et la farine.
Le sel « de régime » = potassium !

Conseils :

1. Consommez max 4 rations/j (1 ration = env. 150/180g de légumes, pomme de terre, légumes secs ou 1 fruit).
2. Les légumes cuits et les fruits cuits contiennent moins de potassium que consommés crus.
3. Une cuisson dans un grand volume d'eau sans utiliser le bouillon obtenu, permet une perte importante de potassium



Si vous avez des questions, vous avez la possibilité de rencontrer une diététicienne, n'hésitez pas à la contacter par l'intermédiaire des secrétaires ou des infirmières.

Document réalisé pour l'information des patients dans le cadre d'une étude clinique grâce à l'aide d'une diététicienne (Agnès Solirou) du CHU de Reims.

159

Table des illustrations

Figure 1. Structure de la ciclosporine.....	11
Figure 2. Métabolisme digestif de la ciclosporine	12
Figure 3. Métabolisme de la ciclosporine	13
Figure 4. Mécanisme d'action des anticalcineurines	14
Figure 5. Activation lymphocytaire	15
Figure 6. Interactions anticalcineurines-cyclophilines-calcineurine représentées par cristallographie.....	16
Figure 7. Vasoconstriction induite par la ciclosporine.....	23
Figure 8. Représentation schématique du Récepteur Minéralocorticoïde (gène, ARNm et protéine)	26
Figure 9. Le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.	27
Figure 10. Fonctions cellulaires du Récepteur Minéralocorticoïde	28
Figure 11. Génération des souris invalidées pour le Récepteur Minéralocorticoïde dans les Cellules Musculaires Lisses Vasculaire.	42
Figure 12. Diagramme de flux de l'inclusion des patients dans l'étude EpleCsAT: Safety.	47
Figure 13. Lésions rénales induites par la ciclosporine au cours du modèle murin.....	50
Figure 14. Score de vacuolisation tubulaire chez les souris FVB/N et C57/Bl6.	51
Figure 15. Mécanisme proposé d'interaction entre la ciclosporine et le Récepteur Minéralocorticoïde dans les Cellules Musculaires Lisses Vasculaires : la signalisation calcique.....	81
Figure 16. Mécanisme proposé d'interaction entre la ciclosporine et le Récepteur Minéralocorticoïde dans les Cellules Musculaires Lisses Vasculaires : la calcineurine.....	82
Figure 17. Antagonisme pharmacologique du Récepteur Minéralocorticoïde au cours de la néphrotoxicité de la ciclosporine.....	84
Figure 18. Antagonisme pharmacologique du Récepteur Minéralocorticoïde au cours de la néphrotoxicité du tacrolimus	85

Table des tableaux

Tableau I. Modèles animaux de néphrotoxicité aiguë de la ciclosporine chez la souris.....	40
Tableau II. Score histologique de vacuolisations tubulaires.	44
Tableau III. Protocole de suivi des patients au cours de l'étude EpleCsAT: Safety.	48

Résumé :

La ciclosporine A est un des principaux traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation rénale : son activité inhibitrice de la calcineurine permet d'inhiber l'activation des lymphocytes T lors d'un rejet de greffe. Malgré l'augmentation de survie des transplants qu'elle permet, la ciclosporine présente une néphrotoxicité qui limite son utilisation. Cette toxicité semble en grande partie vasculaire : la ciclosporine induit une augmentation de la vasoconstriction rénale par la dérégulation d'agents vasoactifs ainsi qu'une augmentation de la réponse des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) à ces agents. Par ailleurs, le récepteur minéralocorticoïde (RM), au-delà de ses effets sur la réabsorption sodée dans les épithéliums, agit aussi sur le tonus vasculaire par une action sur la réponse des cellules (endothéliales et musculaires lisses) vasculaires aux agents vasoactifs. Notre hypothèse de travail était que le RM pouvait participer à l'action vasoconstrictrice de la ciclosporine et que son inactivation (pharmacologique ou génique) pourrait permettre de limiter la néphrotoxicité de la ciclosporine. Nous avons généré deux modèles de souris invalidées génétiquement pour le RM : dans les cellules endothéliales et les CMLV. Seules les souris invalidées pour le RM dans les CMLV étaient protégées contre la néphrotoxicité de la ciclosporine. Par ailleurs, nous montrons que ces effets sont médiés par une action sur le tonus vasculaire rénal. Cette prévention est aussi observée lors de l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique du RM (le canrénoate) donné par voie systémique (*per os*). En revanche, la néphrotoxicité induite par le tacrolimus (un autre agent immunosuppresseur inhibant la calcineurine) n'est pas prévenue par l'antagonisme du RM. Enfin, nous proposons d'utiliser un antagoniste sélectif du RM disponible en clinique (l'éplérénone) afin de prévenir la néphrotoxicité de la ciclosporine. Nous avons dû prouver sa bonne tolérance en association à la ciclosporine chez les patients transplantés et présentant une insuffisance rénale chronique : nous montrons que seulement 9 patients (sur 31) ont présenté une hyperkaliémie et qu'aucune n'a engagé le pronostic vital. Nous proposons même que le seuil de 4,35mmol/L de kaliémie à l'initiation du traitement indique un sur-risque de développer une hyperkaliémie. L'efficacité reste à démontrer au cours d'un essai prospectif et randomisé.

Mots clés : [Ciclosporine ; Effets secondaires indésirables des médicaments ; Récepteurs des minéralocorticoïdes ; Myocytes du muscle lisse ; Transplantation rénale]

[Mineralocorticoid Receptor activation and cyclosporine A-induced nephrotoxicity]

Abstract :

Cyclosporine A (cyclo) is a widely used drug in kidney transplantation: its anticalcineurin action inhibits T lymphocytes activation and prevents allograft rejection. Despite a huge benefit on graft survival, cyclo exerts a side effect that limits its use: nephrotoxicity. Vasculotoxicity appears to be central: cyclo enhances renal vasoconstriction by altering vasoactive factors and vascular smooth muscle cells (VSMC) response to vasoactive factors. Beyond its effects on sodium reabsorption, Mineralocorticoid Receptor (MR) acts on vascular tone by modulating both endothelial and VSMC responses to vasoactive factors. Our working hypothesis was that MR could participate to cyclo-induced vasoconstriction and that MR inactivating (pharmacologically or genetically) could alleviate cyclo-induced nephrotoxicity. Two genetically MR-knock out (MR-KO) were generated: in endothelial or VSMC. Only VSMC MR-KO mice were protected from cyclo-induced nephrotoxicity. We also show that such an effect was mediated by vascular tone modulation. This prevention was also conferred by the systemic pharmacological antagonism of MR (by canrenoate) in mice but not during nephrotoxicity induced by tacrolimus (another anticalcineurine drug used in kidney transplantation). Then, we proposed to use MR pharmacological antagonism in humans (by eplerenone) during kidney transplantation. We first had to prove its safety in such a population. Among 31 cyclo-treated patients, only 9 developed hyperkalemia ($>5\text{mmol/L}$) and none presented serious side effect. We propose a kalemia higher than 4.35mmol/L at baseline to be the marker of a higher risk of developing hyperkalemia under treatment. The efficiency of eplerenone to prevent/alleviate cyclo-induced nephrotoxicity during kidney transplantation should be tested during a randomized controlled trial.

Keywords : [Cyclosporine; Drug-Related Side Effects and Adverse Reactions; Receptors, mineralocorticoid; Myocytes, smooth muscle; Kidney transplantation]